

# 不同体细胞来源人诱导多能干细胞向视网膜类器官分化能力的评价

谢冰冰 关远远 高冠杰 郑丹丹 徐平 宋小景 钟秀凤  
中山大学中山眼科中心 眼科学国家重点实验室, 广州 510060  
通信作者: 钟秀凤, Email: zhongxf7@mail.sysu.edu.cn

**【摘要】 目的** 评价不同体细胞来源的人诱导多能干细胞(hiPSCs)向3D视网膜类器官分化的能力。**方法** 采用血液细胞重编程获得的hiPSCs系绿色荧光蛋白(GFP)标记的BC1细胞(BC1-GFP)及Gibco/尿液细胞重编程获得的hiPSCs系UE017进行视网膜诱导分化。光学显微镜下记录视网膜形态的发生和发展过程,采用免疫荧光染色法检测获得的视网膜中各种细胞亚类的特异性分子标志物表达情况,对不同细胞系分化视网膜的效率进行分析和比较。**结果** 血液和尿液细胞来源的hiPSCs均可成功诱导分化为3D视网膜类器官,包括神经视网膜和视网膜色素上皮细胞。视网膜类器官能够模拟体内视网膜的发育过程,逐渐分化出所有神经视网膜亚类细胞,包括视网膜神经节细胞、光感受器细胞、无长突细胞、水平细胞、双极细胞和Müller细胞,甚至形成板层状结构。2种体细胞来源的hiPSCs在分化为视网膜类器官的效率上存在差异,血液来源的细胞比尿液来源的细胞分化为视网膜类器官的效率更高。**结论** 血液和尿液体细胞来源的hiPSCs均可诱导出3D视网膜类器官,获得的视网膜类器官中包括所有视网膜细胞亚类,但2种体细胞来源的hiPSCs分化成视网膜类器官的效率不同。

**【关键词】** 人诱导多能干细胞; 诱导分化; 视网膜类器官; 视网膜亚类细胞

**基金项目:** 广东省科技计划项目(2017B020230003); 广州市科技计划项目(201803010078); 科技部国家重点研发计划项目(2017YFA0104101、2016YFC1101103); 国家自然科学基金项目(81570874、81970842); 中山大学百人计划项目(PT1001010); 中山大学中山眼科中心眼科学国家重点实验室PI经费支持项目

DOI:10.3760/cma.j.cn115989-20200805-00563

## Evaluation of the retinal differentiation ability of human induced pluripotent stem cells reprogrammed from different somatic cells

Xie Bingbing, Guan Yuanyuan, Gao Guanjie, Zheng Dandan, Xu Ping, Song Xiaojing, Zhong Xiufeng  
State Key Laboratory of Ophthalmology, Zhongshan Ophthalmic Center, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510060, China

Corresponding author: Zhong Xiufeng, Email: zhongxf7@mail.sysu.edu.cn

**【Abstract】 Objective** To evaluate the retinal differentiation ability of human induced pluripotent stem cells (hiPSCs) from various somatic cell sources. **Methods** The hiPSCs lines BC1- green fluorescent protein (GFP) and Gibco obtained by blood cell reprogramming and the hiPSCs line UE017 obtained by urine cell reprogramming were used to induce retinal differentiation. The morphogenesis and development of retina were recorded with an optical microscope, and the expression of specific molecular markers of various cell subclasses in the retina was detected by immunofluorescence, and the efficiency of retinal differentiation of different cell lines was analyzed and compared.

**Results** All three hiPSC lines derived from blood and urine cells were able to be induced into three-dimensional (3D) retinal organoids, including neuroretina and retinal pigment epithelial cells. Retinal organoids simulated the development process of retina *in vivo* and gradually differentiated into all cell subtypes of retina, including retinal ganglion cells, photoreceptor cells, amacrine cells, horizontal cells, bipolar cells, Müller cells, and even formed lamellar structures. However, in terms of the efficiency of acquiring retinal organoids, the hiPSCs derived from blood were more efficient than those derived from urine. **Conclusions** hiPSCs from both blood and urine somatic cells can differentiate into 3D retinal organoids, including all subtypes of retinal cells. The differentiation efficiency among lines

is different.

[Key words] Human induced pluripotent stem cells; Differentiation; Retinal organoids; Retinal cell subtypes

**Fund program:** The Science & Technology Project of Guangdong Province (2017B02023003); The Guangzhou Science and Technology Project Fund (201803010078); The National Key R&D Program of China (2017YFA0104101, 2016YFC1101103); National Natural Science Foundation of China (81570874, 81970842); Hundred Talent Program of Sun Yat-sen University (PT1001010); Fundamental Research Funds of the State Key Laboratory of Ophthalmology, the Zhongshan Ophthalmic Center Fund

DOI: 10.3760/cma.j.cn115989-20200805-00563

视网膜退行性疾病,如视网膜色素变性、年龄相关性黄斑变性是导致人视力丧失的主要原因,其病理机制是光感受器细胞、视网膜色素上皮(retinal pigment epithelium, RPE)细胞的变性丢失,进而在疾病晚期造成其他类型的视网膜细胞凋亡。由于这些细胞损伤后无法再生,因此迄今为止视网膜退行性疾病尚无有效的治疗方法<sup>[1-3]</sup>。人诱导多能干细胞(human induced pluripotent stem cells, hiPSCs)是将终末分化的体细胞经过外源强制表达重编程基因,如 *OCT4*、*SOX2*、*KLF4* 和 *c-MYC* 转化获得的一类具有自我复制和多向分化潜能的细胞,类似胚胎干细胞<sup>[4]</sup>。研究表明,在特定培养条件下,hiPSCs 可在体外诱导分化出几乎所有类型的细胞,如心肌细胞、神经细胞、造血干细胞和视网膜细胞<sup>[5-10]</sup>。目前几乎所有体细胞都可通过基因重编程技术转化为 hiPSCs,包括成纤维细胞、外周血细胞、脐带血细胞、间充质干细胞、骨髓细胞,甚至尿液细胞<sup>[11-14]</sup>,然而,并非所有的 hiPSCs 在体外分化成目标细胞的能力都相同<sup>[15]</sup>。不同组织体细胞来源的 hiPSCs,甚至同一组织的体细胞来源的不同克隆 hiPSCs 在分化潜力上也存在差异。本研究团队一直致力于 hiPSCs 向视网膜类器官分化的研究,并发现不同细胞系在分化为视网膜类器官方面存在一定的差异。了解不同体细胞来源 hiPSCs 向视网膜类器官的分化能力成为相关研究的关键环节之一。本研究拟对不同体细胞来源的 hiPSCs 向视网膜类器官分化的能力进行评估,为相关领域的基础及临床研究提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 细胞来源** 绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)标记的 BC1 细胞系<sup>[16]</sup>(BC1-GFP)(中国科学技术大学程临钊教授惠赠);Gibco 细胞系(美国 Gibco 公司);UE017 细胞系<sup>[17]</sup>(中国科学院广州生物医药与健康研究院潘光锦教授惠赠)。

**1.1.2 主要试剂** mTeSR1 培养基(85850,美国 Stem

Cell 公司);0.5 mol/L EDTA(15575020,美国 Invitrogen 公司);磷酸盐缓冲液(phosphate buffer solution, PBS)(GNM10010,杭州吉诺生物医药技术有限公司);基质胶(354277,美国 Corning 公司);(-)-Blebbistatin(B0560,美国 Sigma 公司);DMEM/F12(C11330500BT)、DMEM BASIC(C11995500BT)、N2(17502048)、B27(12587010)、NEAA(11140050)、GlutaMax(35050061)、抗菌-抗真菌剂(15240062)(美国 Gibco 公司);兔抗人 OCT4 抗体(A7920, 1:200)、兔抗人 ISLET1(A5245, 1:100)(美国 Abclonal 公司);鼠抗人 TRA-1-60 抗体(ab16288, 1:100)、兔抗人 OTX2 抗体(ab21990, 1:500)、鼠抗人 rhodopsin 抗体(ab3267, 1:200)、鼠抗人 CRALBP 抗体(ab15051, 1:500)、兔抗人 PKC $\alpha$ (ab32376, 1:2000)(英国 Abcam 公司);山羊抗人 BRN3 抗体(sc-6026, 1:100)、鼠抗人 HUD 抗体(sc-48421, 1:200)(美国 Santa Cruz 公司);兔抗人 recoverin 抗体(ab5585, 1:500)(美国 Millipore 公司);鼠抗人 AP2 $\alpha$  抗体(3B5-S, 1:50)(美国 DSHB 公司);驴抗小鼠 IgG Alexa Flour-555(A31570, 1:500)、驴抗兔 IgG Alexa Flour-555(A31572, 1:500)、驴抗山羊 IgG Alexa Flour-555(A21432, 1:500)(美国 Invitrogen 公司);DAPI [D523, 中国东仁化学科技(上海)有限公司];抗荧光淬灭封片剂(P0126, 上海碧云天生物技术有限公司)。

### 1.2 方法

**1.2.1 hiPSCs 的扩增培养** BC1-GFP、Gibco 及 UE017 细胞系在 mTeSR1 培养基中保持无饲养层培养。待细胞融合率约为 90% 时用 0.5 mmol/L EDTA 消化传代,将细胞接种到基质胶包被的培养板或盖玻片上。倒置显微镜下观察细胞的生长状态,用移液枪枪头于显微镜下剔除明显分化的细胞。

**1.2.2 荧光染色法鉴定 hiPSCs 的干细胞特性** 收集接种细胞的盖玻片,置于质量分数 4% 多聚甲醛中,室温下固定 10 min, PBS 洗涤,室温下用通透封闭液处理 1 h。滴加兔抗人 OCT4 一抗(工作浓度 1:200)及小

鼠抗人 TRA-1-60 一抗(工作浓度 1:100), 4℃ 孵育 20 h, 吸弃一抗, PBS 洗涤后滴加驴抗兔 IgG Alexa Flour-555(工作浓度 1:500)、驴抗小鼠 IgG Alexa Flour-555(工作浓度 1:500), 室温下孵育 1 h。吸弃二抗并 PBS 洗涤, DAPI 染色, 封片, 正置荧光显微镜下观察 hiPSCs 中 OCT4 及 TRA-1-60 表达情况, 并采集图片。

**1.2.3 hiPSCs 的分化及拟胚体形成过程** 参照文献[17-21]中描述的多步骤 3D 视网膜类器官诱导方案进行 hiPSCs 的分化, 首先制备拟胚体。参照 1.2.1 中描述的方法进行 hiPSCs 消化传代, 将 hiPSCs 消化成小片, 离心后去上清, 用含 10 μmol/L Blebbistatin 的 mTeSR1 重悬, 接种到 100 mm 低吸附皿内悬浮培养。此后 3 d 培养基逐渐转变为神经诱导培养基(neural induction medium, NIM), 消化当天记录为分化第 0 天(D0)。

**1.2.4 hiPSCs 向视网膜类器官的诱导分化** 分化后第 5~7 天, 收集悬浮培养的拟胚体, 接种于基质胶包被的培养板或培养皿内进行贴壁培养, 每周换液 2~3 次。培养后第 16 天将 NIM 更换为视网膜分化培养基(retinal differentiation medium, RDM), 继续贴壁培养。分化后第 4~5 周待类圆形早期视泡样结构形成, 于显微镜下进行鉴别, 机械分离类圆形的视泡样结构并移入低吸附培养皿内悬浮培养。分化后 40 d, RDM 中补充体积分数 10% 胎牛血清以长期维持悬浮培养。倒置显微镜下拍照以记录 hiPSCs 向视网膜类器官发育的形态变化。

**1.2.5 不同细胞系视网膜类器官分化效率比较** 由同一研究人员按照上述方法对 3 株 hiPSCs 系进行视网膜诱导分化, 对生长状态良好及未分化的 hiPSCs 消化后计数细胞。每个细胞系均取  $0.5 \times 10^6$  个细胞用于分化, 且独立分化实验至少重复 3 次, 每批次实验每个细胞系设立至少 3 个复孔。细胞分化到第 28 天用 1 ml 注射器针头显微镜下挑取视泡, 汇总视泡数量。

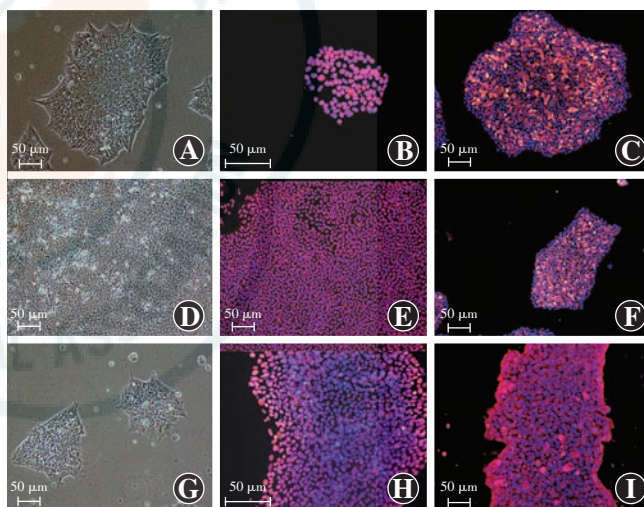
**1.2.6 免疫荧光法鉴定视网膜细胞类型** 收取不同分化时段的 3D 视网膜, 用 4% 多聚甲醛室温固定 30 min, 蔗糖梯度脱水, OCT 包埋, 冰冻切片, 按常规方法进行免疫荧光染色。滴加山羊源 BRN3 抗体(1:200)、兔源 HUD 抗体(1:200)、兔源 ISLET1 抗体(1:200), 兔源 recoverin 抗体(1:500)、兔源 OTX2 抗体(1:500)、小鼠源 rhodopsin 抗体(1:200)、小鼠源 AP2α 抗体(1:50)、兔源 PKCα 抗体(1:500)及兔源 CRALBP 抗体(1:500), 4℃ 孵育 20 h, PBS 洗涤并滴加驴抗鼠 IgG Alexa Flour-555(1:500)、驴抗兔 IgG

Alexa Flour-555(1:500)及驴抗山羊 IgG Alexa Flour-555(1:500), 室温下孵育 1 h, PBS 洗涤后 DAPI 复染 5 min, 封片。正置荧光显微镜下观察各个样本视网膜细胞类型标志物表达情况, 并采集图片。

## 2 结果

### 2.1 hiPSCs 形态特征及干性鉴定

BC1-GFP、Gibco、UE017 3 株 hiPSCs 系在基质胶包被的培养板内均呈克隆状生长, 传代后 5 d 融合率约为 90%。克隆外围边界清晰, 内部细胞排列紧密, 分界不清。细胞体积小, 细胞核大, 细胞质少。iPSCs 特征性标志蛋白 OCT4 及 TRA-1-60 在 3 个细胞系中均有表达, 呈红色强荧光, OCT4 蛋白表达于细胞核, TRA-1-60 蛋白表达于细胞膜。3 株细胞系在形态、生长方式及分子标志物表达方面均未显示明显差异(图 1)。



**图 1** 荧光显微镜下不同来源 hiPSCs 形态及干性标志物表达(Alexa Flour-555, 标尺 = 50 μm) A: BC1-GFP 细胞系呈克隆状生长, 外围边界清晰, 内部细胞排列紧密 B: BC1-GFP 细胞系多潜能标志物 OCT4 表达于细胞核, 呈红色荧光 C: BC1-GFP 细胞系多潜能标志物 TRA-1-60 表达于细胞膜, 呈红色荧光 D: Gibco 细胞系呈克隆状生长 E: Gibco 中 OCT4 表达于细胞核, 呈红色荧光 F: Gibco 细胞系 TRA-1-60 表达于细胞膜, 呈红色荧光 G: UE017 细胞系呈克隆状生长 H: UE017 细胞系 OCT4 表达于细胞核, 呈红色荧光 I: UE017 细胞系 TRA-1-60 表达于细胞膜, 呈红色荧光

**Figure 1** Morphology and expression of pluripotency markers in different derived hiPSCs under fluorescence microscope(Alexa Flour-555, bar = 50 μm) A: BC1-GFP grew in clony with clear boundary and regularly arrangement B: The pluripotency marker OCT4 was strongly expressed in nucleus of BC1-GFP with red fluorescence C: The pluripotency marker TRA-1-60 was strongly expressed in cell membrane of BC1-GFP with red fluorescence D: Gibco grew in clony E: OCT4 was strongly expressed in nucleus of Gibco with red fluorescence F: TRA-1-60 was strongly expressed in cell membrane of Gibco with red fluorescence G: UE017 grew in clony H: OCT4 was strongly expressed in nucleus of UE017 with red fluorescence I: TRA-1-60 was strongly expressed in cell membrane of UE017 with red fluorescence

## 2.2 hiPSCs 向视网膜类器官分化过程中形态表现

分化第 1 天, 悬浮培养条件下 BC1-GFP、Gibco、UE017 3 株细胞系均自发聚集, 形成拟胚体, 随后体积逐渐增大。分化后第 5 天, 各细胞系的拟胚体透亮, 大小较均一。接种到贴壁条件继续分化培养时, 拟胚体边缘细胞逐渐向外围迁移、分化, 形成典型的“煎鸡蛋”形态, 呈现出边缘薄、中央厚、淡黄色形态。分化 20 d 后, 3 株细胞系逐渐诱导出数量不等的类圆形、折

光性强的“视泡”样结构, 且各株细胞呈现出一定差异性, 即 BC1-GFP 细胞系分化第 20 天时开始观察到视泡样组织, Gibco 及 UE017 细胞系在分化第 23 天后才陆续出现视泡样组织。分化第 28 天时 3 个细胞系均可获得典型视泡样组织。机械挑起视泡样组织悬浮培养后, 视泡样组织的神经视网膜迅速增长, 体积增厚, 形成半环形, 一端黏附黑色的色素上皮细胞球, 形成类“双层结构的视杯”, 即视网膜类器官(图 2)。

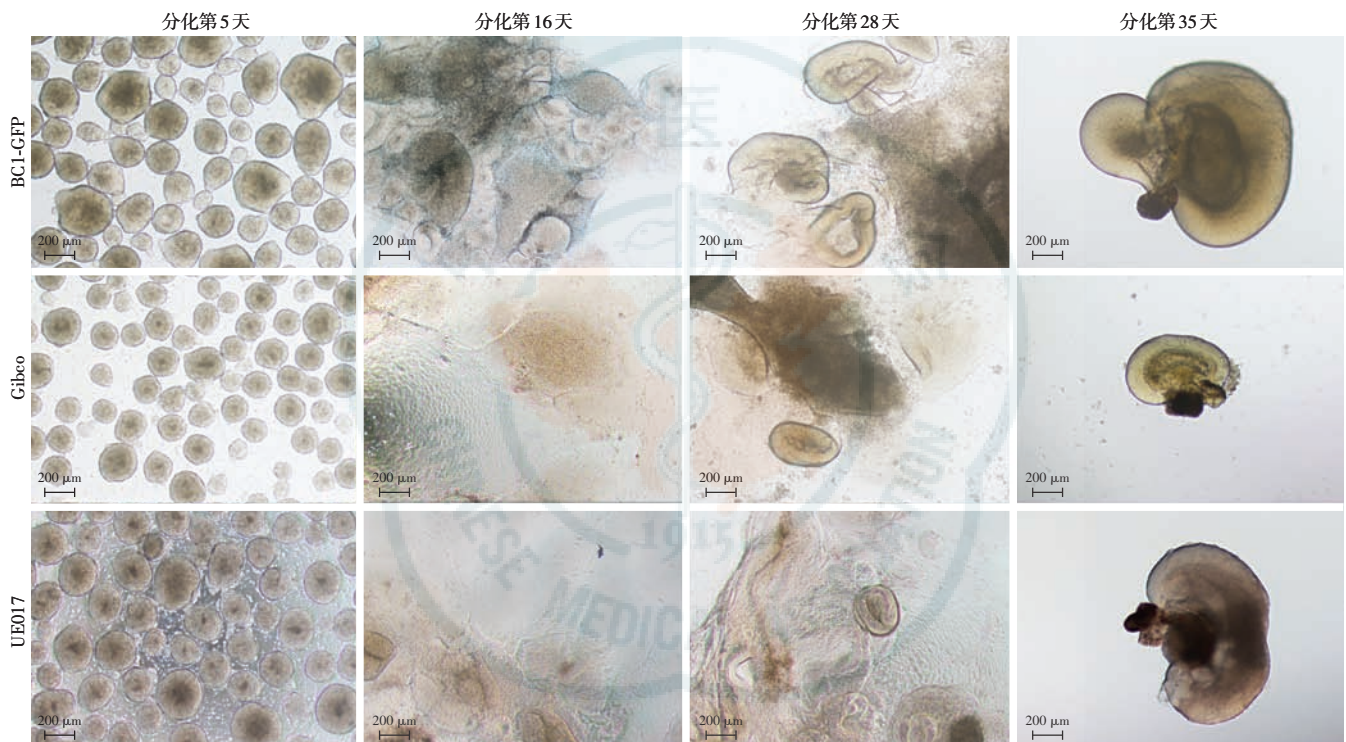


图 2 光学显微镜下 3 种 hiPSCs 向视网膜分化过程中形态变化(标尺 = 200  $\mu\text{m}$ ) 分化第 5 天 BC1-GFP、Gibco、UE017 3 株细胞系均可自发形成大小较均一的拟胚体。分化第 16 天 BC1-GFP 细胞系可见明显的组织增厚, Gibco 及 UE017 细胞系相对组织较薄。分化第 28 天 BC1-GFP 细胞系获得的视泡样结构较多, Gibco 及 UE017 细胞系较少。3 株细胞系均可获得神经视网膜及 RPE 细胞, 神经视网膜折光性好, RPE 细胞可见明显的黑色色素化 GFP: 绿色荧光蛋白

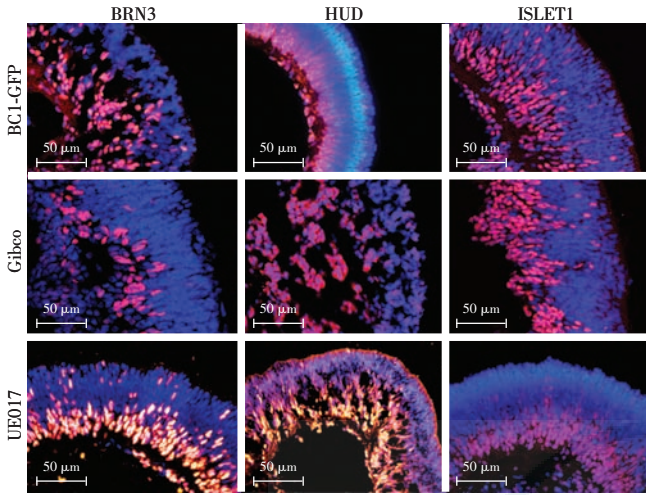
**Figure 2 Differentiation of retinal organoids from three hiPSCs lines** (bar = 200  $\mu\text{m}$ ) All three cell lines spontaneously formed embryoid bodies at the 5th day of differentiation. At the 16th day of differentiation, obvious tissue thickening was observed in the BC1-GFP hiPSCs, but relatively thinner tissues were showed in Gibco and UE017 hiPSCs. At the 28th day of differentiation, more optic vesicle-like structures were presented in BC1-GFP lines in comparison with Gibco and UE017 lines. Under suspension culture, retinal organoids comprising well-reflective neural retina and RPE with obvious pigment were self-formed from all three cell lines GFP: green fluorescent protein

## 2.3 不同来源 hiPSCs 分化获得的视网膜类器官中视网膜神经节细胞标志物的表达

BC1-GFP、Gibco、UE017 3 株细胞系分化获得的 3D 视网膜类器官中视网膜神经节细胞 (retinal ganglion cells, RGCs) 的特异性标志物 BRN3、ISLET1 及 HUD 蛋白均表达阳性, 其中 BRN3 和 ISLET1 表达于细胞核, HUD 蛋白表达于细胞质中, 这些蛋白主要表达在视网膜类器官的基底侧(图 3)。

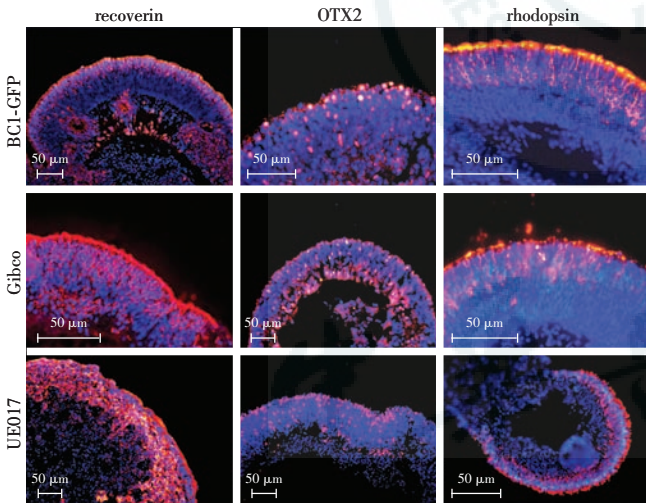
## 2.4 不同来源 hiPSCs 分化获得的视网膜类器官中光感受器标志物的表达

BC1-GFP、Gibco、UE017 3 株 hiPSCs 分化获得的视网膜类器官中 recoverin、OTX2、rhodopsin 均表达阳性, 其中光感受器细胞标志物 recoverin 表达于细胞质中, 光感受器细胞标志物 OTX2 表达于细胞核, 视杆细胞标志物 rhodopsin 表达于视网膜类器官神经层顶端(图 4)。



**图 3** 不同来源 hiPSCs 分化获得视网膜类器官中 RGCs 标志物的表达 (标尺=50 μm) BC1-GFP、Gibco、UE017 细胞系分化的视网膜类器官中可见 BRN3 表达于细胞核,呈红色荧光 (Alexa Flour-555), HUD 表达于细胞质,呈红色荧光 (Alexa Flour-555), ISLET1 表达于细胞核,呈红色荧光 (Alexa Flour-555), 细胞核呈蓝色荧光 (DAPI) GFP:绿色荧光蛋白

**Figure 3** Expression of RGCs markers in retinal organoids differentiated from different hiPSCs (bar = 50 μm) BRN3 was strongly expressed in nucleus of retinal organoids induced from BC1-GFP, Gibco, UE017 lines with red fluorescence (Alexa Flour-555), HUD was strongly expressed in cytoplasm of retinal organoids in the three types of cell lines with red fluorescence (Alexa Flour-555), and ISLET1 was strongly expressed in nucleus of retinal organoids in the three types of cell lines with red fluorescence (Alexa Flour-555). The nucleus showed blue fluorescence (DAPI) GFP: green fluorescent protein

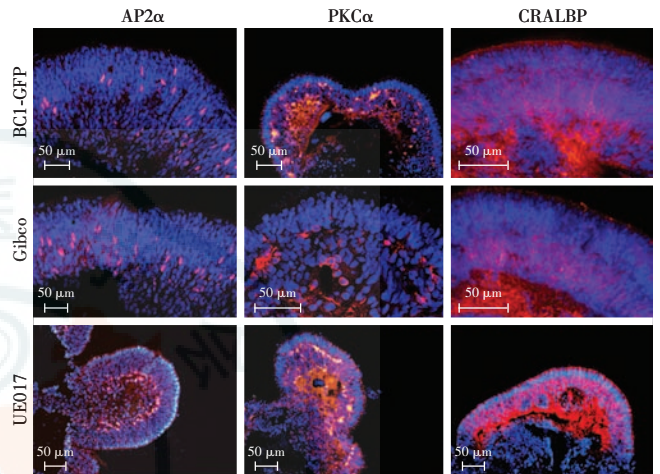


**图 4** 不同来源 hiPSCs 分化获得视网膜类器官中光感受器细胞标志物的表达 (标尺=50 μm) BC1-GFP、Gibco、UE017 细胞系分化的视网膜类器官中可见光感受器细胞标志物 recoverin 强表达于细胞质中,呈红色荧光 (Alexa Flour-555); 光感受器细胞标志物 OTX2 强表达于细胞核,呈红色荧光 (Alexa Flour-555); 视杆细胞标志物 rhodopsin 强表达于细胞质中,呈红色荧光 (Alexa Flour-555)。细胞核呈蓝色荧光 (DAPI) GFP:绿色荧光蛋白

**Figure 4** Expression of photoreceptor cell markers in retinal organoids differentiated from different hiPSCs (bar = 50 μm) Photoreceptor cell marker recoverin was strongly expressed in cytoplasm of retinal organoids induced from BC1-GFP, Gibco, UE017 cell lines with red fluorescence (Alexa Flour-555); photoreceptor cell marker OTX2 was strongly expressed in nucleus of retinal organoids in the three types of cell lines with red fluorescence (Alexa Flour-555), and rod cell marker rhodopsin was strongly expressed in cytoplasm of retinal organoids in the three types of cell lines with red fluorescence (Alexa Flour-555). The nucleus showed blue fluorescence (DAPI) GFP: green fluorescent protein

**2.5 不同来源 hiPSCs 分化获得的视网膜类器官中其他类型视网膜细胞标志物的表达**

BC1-GFP、Gibco、UE017 3 株 hiPSCs 分化获得的视网膜类器官中可见无长突细胞标志物 AP2α 阳性细胞、双极细胞标志物 PKCα 阳性细胞及 Müller 细胞标志物 CRALBP 阳性的细胞亚型(图 5)。



**图 5** 不同来源 hiPSCs 分化获得视网膜类器官中其他类型视网膜细胞标志物的表达 (标尺=50 μm) BC1-GFP、Gibco、UE017 细胞系分化的视网膜类器官中可见无长突细胞标志物 AP2α 强表达于细胞核,呈红色荧光 (Alexa Flour-555); 双极细胞标志物 PKCα 和 Müller 细胞标志物 CRALBP 强表达于 BC1-GFP、Gibco、UE017 细胞系分化视网膜类器官的细胞质,呈红色荧光 (Alexa Flour-555)。细胞核呈蓝色荧光 (DAPI) GFP:绿色荧光蛋白

**Figure 5** Expression of other retinal cell markers in retinal organoids differentiated by hiPSCs (bar = 50 μm) Amacrine cell marker AP2α was strongly expressed in nucleus of retinal organoids induced from BC1-GFP, Gibco, UE017 cell lines with red fluorescence (Alexa Flour-555); Bipolar cell marker PKCα and Müller cell marker CRALBP were strongly expressed in cytoplasm of retinal organoids induced from BC1-GFP, Gibco, UE017 cell lines with red fluorescence (Alexa Flour-555). The nucleus showed blue fluorescence (DAPI) GFP: green fluorescent protein

**2.6 不同来源 hiPSCs 向视网膜分化的效率比较**

在同样起始量  $0.5 \times 10^6$  个细胞的分化条件下及同样的诱导条件下, BC1-GFP 细胞系每批次分化平均可获得  $(50 \pm 2)$  个视网膜类器官 ( $n = 3$ ), 每 10 000 个细胞平均可获得 1 个视网膜类器官; Gibco 细胞系每批次分化平均可获得  $(28 \pm 5)$  个视网膜类器官 ( $n = 3$ ), 每 10 000 个细胞平均可获得 0.56 个视网膜类器官; UE017 细胞系每批次分化平均可获得  $(24 \pm 7)$  个视网膜类器官 ( $n = 3$ ), 每 10 000 个细胞平均可获得 0.48 个视网膜类器官。BC1-GFP 细胞系的视网膜分化效率明显高于 Gibco 细胞系和 UE017 细胞系。

### 3 讨论

hiPSCs 由山中伸弥于 2007 年利用病毒载体将 4 个转录因子组合转入分化的体细胞中而获得, 此类细胞在形态、基因和蛋白表达、类胚体和畸胎瘤生成能力、分化能力等方面都与胚胎干细胞相似<sup>[4]</sup>。成纤维细胞是最早由重编程技术获得 hiPSCs 的体细胞, 但成纤维细胞多数需要通过有创手术来获取, 获取成本高, 捐赠者较少。研究发现, 外周血和脐带血细胞也可诱导为 hiPSCs, 与成纤维细胞相比, 其获取成本大大降低, 捐赠者数量也明显增加, 且突变风险较低, 诱导成功率也大大提高。近年来可用于重编程获得 hiPSC 的体细胞陆续被报道, 包括间充质干细胞、骨髓细胞, 甚至尿液细胞。尿液细胞不仅获取便利, 其重编程的效率也较高, 利于下游相关研究的进一步开展<sup>[22]</sup>。

利用人胚胎干细胞和 hiPSCs 向视网膜诱导分化的方法有多种, 大致分为 2D 贴壁分化法和 3D 悬浮分化法。2006 年, Reh 团队首先通过 2D 贴壁分化方法成功将人胚胎干细胞诱导分化为视网膜祖细胞及 RGCs<sup>[23]</sup>; 2008 年, Osakada 等<sup>[24]</sup>又分别将小鼠、猴及人胚胎干细胞在贴壁条件下诱导获得了光感受器细胞, 包括视杆细胞和视锥细胞。虽然 2D 分化方法可获得多种视网膜细胞亚类, 但这些细胞混合生长在一起, 也没有类似于人类视网膜的组织结构, 因此靶细胞分离纯化困难, 耗时耗力, 影响相关应用研究的进一步开展。2011 年, Sasai 团队首次利用 3D 悬浮培养方法成功诱导小鼠胚胎干细胞自发形成视杯样结构, 随后以类似诱导方案成功获得人胚胎干细胞分化而来的视泡, 首次在体外观察到人类视网膜的早期发育动态过程——视杯的形态发生<sup>[25-26]</sup>。2014 年, Zhong 等<sup>[19]</sup>通过悬浮-贴壁-再悬浮等多步骤诱导方案首次成功将 hiPSCs 诱导分化为具有光反应功能的视网膜类器官。这些研究说明 hiPSCs 在 3D 诱导条件下不仅可以分化为各种视网膜亚类细胞, 还可诱导出具有组织结构和生理功能的视网膜类器官。本研究采用多步骤视网膜诱导分化方案<sup>[19-21]</sup>对不同体细胞来源的 hiPSCs 向视网膜类器官分化的能力进行评价。

本研究中将 2 株血液细胞和 1 株尿液细胞重编程来源的 hiPSCs 进行体外诱导分化, 均可获得视网膜类器官。然而, 3 株细胞系在分化效率上略有差异。血液细胞来源的 BC1-GFP 及 Gibco hiPSCs 细胞系获得视网膜类器官的效率优于尿液来源的 UE017; 尤其是, 同样为血液来源的 BC1-GFP 与 Gibco hiPSCs 细胞系的视网膜分化效率也存在差异, 前者高于后者。Mills

等<sup>[27]</sup>研究也发现, 来自同一患者体细胞的 iPSCs 在基因表达、增生率和造血发育潜能等方面更相似, 而来自不同患者的 iPSCs 在基因表达、增生率和造血发育潜能等方面差异较大。造成这些差异的机制尚不明确, 可能与细胞内在遗传或表观遗传特征、重编程方案、体细胞类型、诱导方案, 甚至实验者的技术均有关<sup>[15]</sup>。本研究中为了控制系统性实验误差, 由同一研究人员采用相同的分化方案进行视网膜诱导分化实验, 结果表明不同体细胞来源的 hiPSCs 在分化能力上的确存在差异, 但本研究没有排除引起差异的其他因素, 尚需进一步研究。

hiPSCs 体外诱导分化获得视网膜类器官不仅为视网膜发育和发病机制研究提供了良好的研究模型, 也可为视网膜退行性疾病的新疗法, 即细胞移植提供种子细胞, 解决人视网膜移植供体来源不足等瓶颈问题。本研究中发现不同体细胞来源的 hiPSCs 均可诱导分化为视网膜类器官, 为视网膜变性疾病的视网膜移植治疗研究奠定了良好的基础, 但不同体细胞来源的 hiPSCs 在分化成视网膜类器官的效率上存在一定差异, 其具体机制仍需进一步研究。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

### 参考文献

- [1] Mitchell P, Liew G, Gopinath B, et al. Age-related macular degeneration [J]. *Lancet*, 2018, 392 (10153): 1147-1159. DOI: 10.1016/S0140-6736(18)31550-2.
- [2] Veleri S, Lazar CH, Chang B, et al. Biology and therapy of inherited retinal degenerative disease: insights from mouse models [J]. *Dis Model Mech*, 2015, 8(2): 109-129. DOI: 10.1242/dmm.017913.
- [3] Dalvi S, Galloway CA, Singh R. Pluripotent stem cells to model degenerative retinal diseases; the RPE perspective [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2019, 1186: 1-31. DOI: 10.1007/978-3-030-28471-8-1.
- [4] Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors [J]. *Cell*, 2007, 131(5): 861-872. DOI: 10.1016/j.cell.2007.11.019.
- [5] Breckwoldt K, Letuffe-Brenière D, Mannhardt I, et al. Differentiation of cardiomyocytes and generation of human engineered heart tissue [J]. *Nat Protoc*, 2017, 12(6): 1177-1197. DOI: 10.1038/nprot.2017.033.
- [6] Kimura H, Ouchi T, Shibata S, et al. Stem cells purified from human induced pluripotent stem cell-derived neural crest-like cells promote peripheral nerve regeneration [J/OL]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 10071 [2020-07-11]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6030210/>. DOI: 10.1038/s41598-018-27952-7.
- [7] Lim WF, Inoue-Yokoo T, Tan KS, et al. Hematopoietic cell differentiation from embryonic and induced pluripotent stem cells [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2013, 4(3): 71-71. DOI: 10.1186/scrt222.
- [8] Reichman S, Slembrouck A, Gagliardi G, et al. Generation of storable retinal organoids and retinal pigmented epithelium from adherent human iPSC cells in xeno-free and feeder-free conditions [J]. *Stem Cells*, 2017, 35(5): 1176-1188. DOI: 10.1002/stem.2586.
- [9] Shrestha R, Wen YT, Ding DC, et al. Aberrant hiPSCs-derived from human keratinocytes differentiates into 3D retinal organoids that acquire mature photoreceptors [J/OL]. *Cells*, 2019, 8(1): 36 [2020-07-12]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6356277/>. DOI: 10.3390/cells8010036.
- [10] Reichman S, Terray A, Slembrouck A, et al. From confluent human iPSC cells to self-forming neural retina and retinal pigmented epithelium [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014, 111(23): 8518-8523. DOI:

- 10.1073/pnas.1324212111.
- [11] Haase A, Olmer R, Schwanke K, et al. Generation of induced pluripotent stem cells from human cord blood [J]. Cell Stem Cell, 2009, 5(4): 434-441. DOI: 10.1016/j.stem.2009.08.021.
- [12] Wang Y, Liu J, Tan X, et al. Induced pluripotent stem cells from human hair-follicle mesenchymal stem cells [J]. Stem Cell Rev, 2013, 9(4): 451-460.
- [13] Beltrão-Braga PC, Pignatari GC, Maiorka PC, et al. Feeder-free derivation of induced pluripotent stem cells from human immature dental pulp stem cells [J]. Cell Transplant, 2011, 20(11-12): 1707-1719. DOI: 10.3727/096368911X566235.
- [14] Zhou T, Benda C, Dunzinger S, et al. Generation of human induced pluripotent stem cells from urine samples [J]. Nat Protoc, 2012, 7(12): 2080-2089. DOI: 10.1038/nprot.2012.115.
- [15] Cahan P, Daley GQ. Origins and implications of pluripotent stem cell variability and heterogeneity [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2013, 14(6): 357-368. DOI: 10.1038/nrm3584.
- [16] Zou C, Chou BK, Dowe SN, et al. Efficient derivation and genetic modifications of human pluripotent stem cells on engineered human feeder cell lines [J]. Stem Cells Develop, 2012, 21(12): 2298-2311. DOI: 10.1089/scd.2011.0688.
- [17] Xue Y, Cai X, Wang L, et al. Generating a non-integrating human induced pluripotent stem cell bank from urine-derived cells [J/OL]. PLoS One, 2013, 8(8): e70573 [2020-07-18]. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23940595/. DOI: 10.1371/journal.pone.0070573.
- [18] Li G, Xie B, He L, et al. Generation of retinal organoids with mature rods and cones from urine-derived human induced pluripotent stem cells [J/OL]. Stem Cells Int, 2018: 4968658 [2020-07-12]. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30008752/. DOI: 10.1155/2018/4968658.
- [19] Zhong X, Gutierrez C, Xue T, et al. Generation of three-dimensional retinal tissue with functional photoreceptors from human iPSCs [J/OL]. Nat Commun, 2014, 5: 4047 [2020-07-12]. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24915161/. DOI: 10.1038/comms5047.
- [20] Luo Z, Zhong X, Li K, et al. An optimized system for effective derivation of three-dimensional retinal tissue via WNT signaling regulation [J]. Stem Cells, 2018, 36(11): 1709-1722. DOI: 10.1002/stem.2890.
- [21] Li G, Gao G, Wang P, et al. Generation and characterization of induced pluripotent stem cells and retinal organoids from a Leber's congenital amaurosis patient with novel RPE65 mutations [J/OL]. Front Mol Neurosci, 2019, 12: 212 [2020-06-19]. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31572124/. DOI: 10.3389/fnmol.2019.00212.
- [22] Singh VK, Kumar N, Kalsan M, et al. Mechanism of induction; induced pluripotent stem cells [J]. J Stem Cells, 2015, 10(1): 43-62.
- [23] 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.
- [24] 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.
- [25] 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.
- [26] 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. DOI: 10.1016/j.stem.2012.05.009.
- [27] Mills JA, Wang K, Paluru P, et al. Clonal genetic and hematopoietic heterogeneity among human-induced pluripotent stem cell lines [J]. Blood, 2013, 122(12): 2047-2051. DOI: 10.1182/blood-2013-02-484444.

(收稿日期:2020-07-20 修回日期:2020-08-19)

(本文编辑:尹卫靖)

## · 病例报告 ·

## 外伤性有晶状体眼散光型人工晶状体脱位诊疗一例

何自芳 鲍连云 陈晖

南京大学医学院附属鼓楼医院南京宁益眼科中心 210008

通信作者:陈晖, Email: chenhuji@126.com

DOI: 10.3760/cma.j.cn115989-20190523-00229

## Diagnosis and treatment of traumatic phakic astigmatism implantable collamer lens dislocation; a case report

He Zifang, Bao Liyun, Chen Hui

Ningyi Eye Center, Affiliated Drum-Tower Hospital of Medical College of Nanjing University, Nanjing 210008, China

Corresponding author: Chen Hui, Email: chenhuji@126.com

DOI: 10.3760/cma.j.cn115989-20190523-00229

患者,男,26岁,因左眼外伤后视力下降5d至南京宁益眼科中心就诊。患者既往有高度近视合并散光病史,曾于2012年7月在南京宁益眼科中心行双眼有晶状体眼后房型人工晶状体(implantable collamer lens, ICL)植入术,左眼术前矫正视力为:-10.5 DS/-4.0 DC×175=0.9,角膜地形图检查:K1 40.87@175°, K2 43.62@85°。术中植入散光型后房睫状沟固定型人工晶状体,直径12.5mm,度数:-18.5 DS/+3.5 DC×88(型号:TICM125V4,美国STAAR公司),水平植入时顺时针旋转3°,手术顺利,术后左眼裸眼视力1.0,术后早期按时复查,视力良好无下降。5d前患者左侧鼻部外伤后左眼视力下降,无眼红、眼痛等眼部不适,伴头晕、头痛,无恶心、呕吐等全身症状,于当地医院行眼科检查,发现左眼ICL半脱位。再次入院后眼科检

查:裸眼视力右眼1.0,左眼0.6,眼压右眼21mmHg(1mmHg=0.133kPa),左眼20mmHg。患者鼻根部轻度肿胀,额面部其余部位未见明显伤痕。裂隙灯显微镜下检查可见左眼球结膜轻度充血,角膜透明、KP(-),前房深度正常,房水清,房水闪烁(-),虹膜纹理清,1:30位根切孔可见、通畅,瞳孔呈泪滴状,人工晶状体下方1个脚祥脱出于前房,晶状体尚透明,玻璃体轻度混浊,可见豹纹状眼底(图1~3);右眼球结膜轻度充血,角膜透明、KP(-),前房深度正常,房水清,房水闪烁(-),虹膜纹理清,1:00、7:00位根切孔可见、通畅,瞳孔圆,对光反射灵敏,后房内可见人工晶状体,拱高约1.5CT,余未见明显异常。诊断:(1)左眼ICL半脱位;(2)双眼ICL植入术后;(3)双眼轴性高度近视。入院后行左眼有晶状体眼人工晶状体调位术,术前给