

· 专家述评 ·

人视网膜类器官培养技术的进步与挑战

罗子明^{1,2} 葛坚¹¹中山大学中山眼科中心 眼科学国家重点实验室 广东省眼科及视觉科学重点实验室, 广州 510060; ²School of Medicine, Stanford University, Palo Alto, CA, USA, 94304

通信作者: 葛坚, Email: gejian@mail.sysu.edu.cn

【摘要】 类器官是一种在体外由干细胞诱导分化形成的、与体内器官具有高度相似组织结构的简化版器官, 其中视网膜类器官研究深入且广泛。视网膜类器官的诱导分化技术经历了多次改进, 效率不断提高, 发育程度不断完善。视网膜类器官在作为视网膜发育和疾病模型、替代治疗的种子细胞库等方面有着广阔的应用前景。然而, 视网膜类器官仍有很大的研究空间, 其诱导分化的普适性、高效性、类器官诱导分化的异质性及其与胚胎视网膜发育的差异性等仍是该领域亟待解决的问题。研究人员应深入、细致地了解类器官发育过程中的分子、基因、细胞乃至组织结构等多个层面的调控机制, 以促进视网膜类器官技术的临床应用。

【关键词】 干细胞; 视网膜类器官; 诱导分化

基金项目: 国家自然科学基金项目 (81430009); 国家重点研发计划项目 (2018YFA0108300); 广东省省级科技计划项目 (2014B020225001)

DOI: 10.3760/cma.j.cn115989-20200721-00518

Current research and challenge of human retinal organoid differentiation

Luo Ziming^{1,2}, Ge Jian¹¹State Key Laboratory of Ophthalmology, Guangdong Provincial Key Laboratory of Ophthalmology and Visual Science, Zhongshan Ophthalmic Center, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510060, China; ²School of Medicine, Stanford University, Palo Alto, CA94304, USA

Corresponding author: Ge Jian, Email: gejian@mail.sysu.edu.cn

【Abstract】 The retinal organoid is one of the most widely studied organoids *in vitro*, which is an “organ in a dish” with a highly similar tissue structure to those *in vivo*. Since it was first reported, the differentiation methods of retinal organoids have been continuously developed to improve the differentiation efficiency and achieve further maturation. Retinal organoids have a broad application prospect as developmental and disease models, as well as seed cells for replacement therapy. However, there are still some problems to be solved, including the universality, effectiveness, heterogeneity of retinal organoid differentiation, as well as the difference between retinal organoids development and the real fetal retinal development. Researchers should investigate the regulational mechanism during organoid development from molecular, genetic, cellular and histological structure levels in order to promote the clinical practices of organoid culture technology.

【Key words】 Stem cells; Retinal organoid; Induced differentiation

Fund program: National Natural Science Foundation of China (81430009); National Key R&D Program of China (2018YFA0108300); Science and Technology Planning Projects of Guangdong Province (2014B020225001)

DOI: 10.3760/cma.j.cn115989-20200721-00518

干细胞诱导分化为类器官是干细胞研究领域的热点^[1-2]。类器官是在体外构建的具有三维结构的、缩小和简化版器官, 具有与相应人体器官一致的微观解剖结构。体外构建的类器官来源于组织中的一个或几个细胞、胚胎干细胞 (embryonic stem cells, ESCs) 或诱导多能干细胞 (induced pluripotent stem cells, iPSCs), 这些组织细胞具有自我更新能力和定向分化能力^[3], 可以在三维培养中进行自我构建和组装, 形成相应的

组织排列结构和空间结构。类器官培养技术曾被 *The Scientist* 评为 2013 年最大的科学进步项目之一^[4]。神经系统的组织器官具有极其精密的排列结构, 承担着精确复杂的信号转导功能, 因此神经系统类器官的研究更有意义, 也更具挑战性。

1 视网膜类器官的诱导分化

自 2011 年 Eiraku 等^[5]发表了“视网膜类器官”诱

导分化系统研究报告开始,神经系统中结构最为精密的组织——视网膜的相关研究越来越广泛地被科学家认识。近年来研究者已建立了多种视网膜类器官诱导分化方案,主要分为两类:第一类以 Eiraku 等^[5]首创的诱导方案为蓝本,干细胞在悬浮条件下重聚团形成拟胚体,随后持续在悬浮条件下完成分化,形成视杯结构并向外凸出;第二类是细胞在悬浮条件下形成拟胚体后,拟胚体经过 1~2 周的贴壁分化,随后悬浮形成具有三维结构的视网膜类器官^[6-7]。2018 年, Luo 等^[8]在第二类诱导方案的基础上对拟胚体构建方法进行改良,并增加了诱导分化过程中按需补充 DKK-1 蛋白的步骤,实现了快速提高诱导分化系统效率的目的,并使得该系统能够适用于更多不同来源的 iPSCs。

视网膜类器官在诱导分化过程中序贯经历了前神经板、眼域、视泡、视杯等胚胎眼发育过程中的各标志性阶段,可表达相关特异功能蛋白或转录因子。随后,类器官获得其特有的三维结构,细胞分层紧密排列,并从基底侧向顶侧逐步完成发育、特化、迁移、成熟的过程。视网膜类器官的神经视网膜组织可依次发育,获得视网膜神经节细胞(retinal ganglion cells, RGCs)、水平细胞、无长突细胞、双极细胞、Müller 细胞、光感受器细胞等所有细胞类型,并可呈现 RGC 层、内核层、外核层的视网膜分层结构。

2 视网膜类器官的优势

视网膜类器官的发育情况模拟了胚胎眼发育的过程,为实施一个相对便捷、可视的人源视网膜发育过程研究提供了可能;相较于以往单独诱导分化某一类的视网膜细胞亚型,视网膜类器官可在组织器官层面全面综合地研究某一视网膜细胞亚型的生理特征;同时,由于其具备与胚胎视网膜高度相似的组织结构,且类器官中的视网膜细胞类型更完善以及其细胞亚结构和生理功能状态更接近在体状态,因而与早期二维培养体系中干细胞直接诱导分化为某一种视网膜结构和功能的方法相比较,视网膜类器官更加稳定和可靠。

2.1 视网膜类器官作为疾病模型

由于类器官的发育模拟了胚胎发育的进程,类器官诱导分化的过程本身可作为一个发育学模型以进行相关领域的研究,同时在对起始干细胞的基因修饰、发育过程中转录因子及关键功能蛋白的表达调节研究方面可作为疾病的模型,对视网膜疾病的发病机制、病理生理特点及治疗手段进行探讨。此外,视网膜类器官具有相对便捷、易获得、易于观察的特点,更是药物筛选研究中极具潜力的替代模型^[9-10]。

2.2 视网膜类器官作为替代治疗的种子细胞库

从视网膜类器官中可获得所有视网膜细胞类型,且其具有与体内视网膜高度类似的细胞排列结构及生理功能,这些细胞的命运、特化程度等均有较好的可控性,与 iPSCs 或者 iPSCs 直接分化而来的视网膜细胞比较,视网膜类器官是更安全、可靠的种子细胞来源。此外,由于类器官本身具有三维结构,故类器官的全层或片层可以组织片形式进行移植^[11],组织片与宿主组织间准确进行整合连接,可作为替代治疗的种子细胞。

3 视网膜类器官研究亟待解决的几个问题

3.1 诱导分化的普适性和效率

首先,并非所有的干细胞系均可确保成功诱导分化为视网膜类器官。iPSCs 细胞技术的突出优势之一即为可构建与患者基因背景一致的干细胞,进而实现与患者高度相似的发育模拟过程,并且与患者高度相似的基因表型可为个体化药物的筛选提供依据,同时该干细胞诱导的种子细胞可实现近乎同种同体、低免疫原性的细胞替代治疗。因此,诱导分化系统可否普遍适用于不同基因背景的干细胞系则成为制约其应用于临床的重要因素之一。其次,视网膜类器官诱导分化效率的高低直接决定了可否在药物筛选或替代治疗时获取足够数量级的供体细胞。因此,目前干细胞的诱导分化系统效率较前虽已大大提高,但相对于治疗所需的纯化细胞数量要求而言仍不足,此外,诱导分化无法实现程序化、机械化的流水线操作流程,需要耗费大量的人力、物力,限制了其在临床上的广泛应用。

3.2 视网膜类器官诱导分化的异质性

不同的视网膜类器官诱导分化系统其视网膜类器官成熟时间有所不同,此外即使在同一系统、同一株干细胞、同一批诱导分化中多个视网膜类器官的发育程度及速度也有先后差异。由此可见,视网膜类器官的分化发育过程除了与其基因背景密切相关外,还与表观遗传学、分化环境等多种因素有关。因此,视网膜类器官间的高度异质性会为发育学及药物筛选研究引入一定的干扰因素。作为替代治疗的种子细胞库,视网膜类器官在发育层面的异质性亦限制了其向临床应用的推广。种子细胞需要具有良好的继续分裂增生并向宿主视网膜迁移、整合的能力,但考虑到干细胞成瘤性的风险,种子细胞的命运需要有一定的特化程度,增生能力亦应有所限制。如何平衡迁移整合能力与成瘤性风险之间的关系成为干细胞来源视网膜细胞在替代治疗中应用的关键问题之一。因此,精准测算类器官发育时程、严格界定可供移植应用的时间窗、争取实现视

网膜类器官分化的同步化是富集到足够数量级别、安全、有效种子细胞的前提。

3.3 与胚胎视网膜发育的差异性

首先,虽然视网膜类器官在宏观层面上基本模拟了胚胎视网膜发育的过程,但从遗传学、精细结构及视网膜细胞的存活与凋亡层面上来看,视网膜类器官与胚胎视网膜发育仍有一定的差异。视网膜类器官中 RGCs 的 mRNA 表达谱与同期胚胎视网膜有所不同^[12-13]。视网膜类器官中,RGCs 主要表达 Brn3b,而在胚胎视网膜中,Brn3a 的表达占主要优势。单细胞 RNA 测序技术普及应用后,视网膜类器官与胚胎视网膜间转录表达的差异愈发显现。其次,随着各类视网膜细胞的众多亚型逐渐被发现和认识,视网膜类器官中是否也完善具备了活体视网膜内所具备的众多细胞亚型并具备其相应的功能尚未明确。此外,在视网膜类器官中,RGCs 无法长期存活亦预示着其与真实视网膜发育之间存在的差异。在胚胎视网膜发育后期,RGCs 会经历程序性死亡过程,使原本多层的 RGCs 层减少至单层。而在视网膜类器官中,RGCs 在分化后期逐渐凋亡,提示视网膜类器官中对细胞增生、凋亡、重塑的调控可能尚有欠缺。这些差异提示视网膜类器官并非与在体发育的视网膜完全一致,因此在作为疾病模型开展相关研究时应考虑这些差异带来的研究偏倚和局限性,同时在将其作为移植治疗的种子细胞时,亦需考虑类器官中细胞亚型成分与实际病理生理条件下的不同。

3.4 类器官与纳米组织工程学材料的结合

无论将类器官作为疾病模型还是作为替代治疗的种子细胞库,类器官与纳米组织工程学材料的结合都将为研究带来新的思路。Ma 等^[14]将纳米颗粒与小鼠光感受器结合,使小鼠获得了可感知红外光线的视觉。这类技术未来可以与类器官技术相结合,为该研究应用前的评估增加与人类基因背景高度相近的临床试验,更可以引入不同功能的纳米粒子,对疾病模型的视网膜类器官进行特定细胞类型的结构功能修复,为相关疾病的临床治疗提供新思路。此外,纳米技术与组织工程技术的结合可成为疾病替代治疗中种子细胞的支架和载体,为种子细胞与宿主视网膜整合前提供可附着平台,也可通过释放特定药物、微电流刺激、磁场等信号,引导种子细胞实现与宿主的整合及突触连接。

4 小结

干细胞诱导分化视网膜类器官技术在当下及未来的基础和临床研究中均有着广阔的前景,研究人员应

了解该研究领域仍存在的亟待解决的问题,这些问题有待研究者更深入、细致地了解类器官发育过程中的分子、基因、细胞、组织结构等多个层面的调控机制。干细胞研究和用于临床需要多个交叉学科研究的融合,包括基因组与单细胞测序,发育生物学、组织工程学及临床医学的通力合作,才能逐步解决促进移植细胞和类器官与宿主视网膜的结构整合,建立神经元间的特异性突触连接,有望实现视觉功能恢复的技术难点^[15],促进视网膜类器官技术尽早进入临床应用。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Bredenoord AL, Clevers H, Knoblich JA. Human tissues in a dish: The research and ethical implications of organoid technology [J/OL]. *Science*, 2017, 355 (6322) : eaaaf 9414 [2020-07-08]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28104841/>. DOI: 10.1126/science.aaf9414.
- [2] Yin X, Mead BE, Safaee H, et al. Engineering stem cell organoids [J]. *Cell Stem Cell*, 2016, 18(1) : 25-38. DOI: 10.1016/j.stem.2015.12.005.
- [3] 阴正勤,李世迎,蹇寿.眼科干细胞研究的现状及进一步研究的问题[J]. *中华实验眼科杂志*, 2015, 33(9) : 769-773. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2015.09.001.
Yin ZQ, Li SY, Jian Q. The current study, challenges and application of stem cell transplantation in ophthalmology [J]. *Chin J Exp Ophthalmol*, 2015, 33(9) : 769-773. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2015.09.001.
- [4] Grens K. 2013's big advances in science [J/OL]. *The Scientist*, 2013 [2020-07-10]. <https://www.the-scientist.com/research-round-up/2013s-big-advances-in-science-38220>.
- [5] 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.
- [6] Ohlemacher SK, Iglesias CL, Sridhar A, et al. Generation of highly enriched populations of optic vesicle-like retinal cells from human pluripotent stem cells [J/OL]. *Curr Protoc Stem Cell Biol*, 2015, 32: 1H.8.1-1H.8.20 [2020-07-10]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4353653/>. DOI: 10.1002/9780470151808.sc01h08s32.
- [7] 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 [2020-07-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24915161/>. DOI: 10.1038/ncomms5047.
- [8] 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.
- [9] Lancaster MA, Knoblich JA. Organogenesis in a dish: modeling development and disease using organoid technologies [J/OL]. *Science*, 2014, 345(6194) : 1247125 [2020-07-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25035496/>. DOI: 10.1126/science.1247125.
- [10] Clevers H. Modeling development and disease with organoids [J]. *Cell*, 2016, 165(7) : 1586-1597. DOI: 10.1016/j.cell.2016.05.082.
- [11] McLelland BT, Lin B, Mathur A, et al. Transplanted hESC-derived retina organoid sheets differentiate, integrate, and improve visual function in retinal degenerate rats [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2018, 59(6) : 2586-2603. DOI: 10.1167/iovs.17-23646.
- [12] Luo Z, Xu C, Li K, et al. Islet1 and Brn3 expression pattern study in human retina and hiPSC-derived retinal organoid [J/OL]. *Stem Cells Int*, 2019, 2019 : 8786396 [2020-07-12]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6925930/>. DOI: 10.1155/2019/8786396.
- [13] Langer KB, Ohlemacher SK, Phillips MJ, et al. Retinal ganglion cell

diversity and subtype specification from human pluripotent stem cells [J]. Stem Cell Reports, 2018, 10(4): 1282-1293. DOI: 10.1016/j.stemcr.2018.02.010.

- [14] Ma Y, Bao J, Zhang Y, et al. Mammalian near-infrared image vision through injectable and self-powered retinal nanoantennae [J]. Cell, 2019, 177(2): 243-255. DOI: 10.1016/j.cell.2019.01.038.
- [15] 刘庆淮. 关注视网膜退行性疾病干细胞治疗研究[J]. 中华实验眼科杂志, 2019, 37(11): 849-853. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-

0160.2019.11.001.

Liu QH. Focus on stem cell-based therapy for retinal degenerative diseases[J]. Chin J Exp Ophthalmol, 2019, 37(11): 849-853. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2019.11.001.

(收稿日期:2020-07-21)

(本文编辑:尹卫靖)

· 病例报告 ·

Goldenhar 综合征伴双眼视网膜脉络膜发育异常诊疗一例

冯丙岂¹ 杨洁² 樊宁³ 刘旭阳^{1,4}

¹深圳市眼科医院 暨南大学附属深圳眼科医院 深圳眼科学重点实验室 518040;

²宁波爱尔光明眼科医院 315020; ³南方医科大学深圳医院 518040; ⁴厦门大学附属厦门眼科中心 361005

通信作者:刘旭阳, Email: xliu1213@126.com

基金项目:深圳市科创委国际合作项目(GJHZ20170314102535241);深圳市科创委基础研究项目(JCYJ20190807153005579)

DOI: 10.3760/cma.j.cn115989-20200923-00661

Diagnosis and treatment of Goldenhar syndrome with bilateral chorioretinal dysplasia: a case report

Feng Bingkai¹, Yang Jie², Fan Ning³, Liu Xuyang^{1,4}

¹Shenzhen Eye Hospital, Shenzhen Key Laboratory of Ophthalmology, Jinan University, Shenzhen 518040, China; ²Ningbo Aier

Guangming Eye Hospital, Ningbo 315020, China; ³Shenzhen Hospital of Southern Medical University, Shenzhen 518040, China;

⁴Xiamen Eye Center of Xiamen University, Xiamen 361005, China

Corresponding author: Liu Xuyang, Email: xliu1213@126.com

DOI: 10.3760/cma.j.cn115989-20200923-00661

Fund Program: The Project of Science and Technology Innovation Committee of Shenzhen

(GJHZ20170314102535241, JCYJ20190807153005579)

DOI: 10.3760/cma.j.cn115989-20200923-00661

患儿,男,4岁,家长诉患儿双眼自幼视力不佳于深圳市眼科医院就诊。患儿为第1胎,足月顺产,其母孕期无药物服用史及放射线接触史,父母非近亲婚配,父母及其他家族成员中未见类似遗传性疾病史。4个月前患儿因右眼角膜皮样囊肿于外院行手术治疗,具体治疗过程不详。体格检查:双侧面部对称,听力正常,右耳屏处见2个副耳(图1)。眼科检查:右眼裸眼视力0.1, +7.00 DS 矫正无提高;左眼裸眼视力0.12, +7.00 DS/-1.25 DC×160° 矫正至0.15;双眼眼压未见异常。右眼闭合完全,睑结膜轻度充血,角膜颞下方可见3mm白色斑翳(图2),余角膜透明,前房深度正常,晶状体透明,视盘边界清晰,色淡红,略向鼻下方倾斜,杯盘比为0.2,黄斑中心凹反光未见,黄斑区可见弥漫斑片状色素沉着,视网膜平伏,鼻侧及下方散在白色点状病灶,动脉走行迂曲,周边部沿动脉可见色素沉着带,后极部广泛色素上皮萎缩;左眼角膜透明,前房深度正常,晶状体透明,眼底视盘边界清晰,色淡红,略向鼻下方倾斜,杯盘比为0.3,黄斑中心凹反光未见,黄斑区可见弥漫斑片状色素沉着,视盘鼻下方见约1/2 PD大小视网膜脉络膜凹陷,余视网膜平伏,鼻侧及下方散在白色点状病灶,动脉走行迂曲,周边部沿动脉可见色素沉着带,后极部可见广泛色素上皮萎缩(图3,4)。双眼眼位正,眼球运动不受限,无明显眼球震颤。B型

超声检查示双眼结构未见明显异常;黄斑区OCT示黄斑中心凹厚度右眼为65 μm,左眼为90 μm,双眼视网膜椭圆体带、视网膜色素上皮(retinal pigment epithelium, RPE)层形态不规则,结构紊乱、部分缺失(图5);IOL Master检查示眼轴长度右眼18.70 mm,左眼18.76 mm。诊断:Goldenhar综合征;双眼视网膜脉络膜发育异常;双眼小眼球。患儿佩戴框架眼镜矫正屈光状态,行视功能训练,定期门诊复诊。右侧副耳可择期行手术切除以改善外观,通常不影响患儿听觉。

讨论:Goldenhar综合征(OMIM 164210)是一种罕见的遗传性疾病,因第一、第二鳃弓发育异常,可引起眼、耳、颜面、脊柱等的畸形和缺陷^[1]。Goldenhar综合征的遗传方式尚存争议,多数病例呈现散发,家系报道多为常染色体显性遗传,但不排除常染色体隐性遗传及多基因遗传^[2]。妊娠期母体疾病、药物等环境因素可使Goldenhar综合征发病风险增加^[3]。该病单侧受累患者多见,约占70%;双侧受累患者常一侧症状较重。Goldenhar综合征诊断主要依靠患者临床表现,但诊断标准仍存在争议。Kumer等^[4]提出最低诊断标准应至少包括以下5项中的2项:耳部发育不全、半侧颜面短小、面斜裂、眼球皮样囊肿和/或上眼睑缺损、脊柱畸形。同时,Goldenhar综合征的诊断还需要与其他第一、二鳃弓发育异常相关的综合征鉴别,如