

# 视网膜类器官在体移植及感光细胞长期存活 实验研究

孙筱 谢浩寰 章梅 薛天

中国科学技术大学生命科学与医学部眼科中心 中国科学技术大学生命科学学院 中国科学院脑功能与疾病重点实验室, 合肥 230026

通信作者: 薛天, Email: xuetian@ustc.edu.cn

**【摘要】** **目的** 探究体外将人诱导多能干细胞 (hiPSCs) 定向分化成视网膜类器官 (ROs) 的进程并进行小鼠在体细胞移植。**方法** 使用定向分化培养基使 BC1-eGFP hiPSCs 悬浮培养得到神经球, 培养第 7 天时将神经球贴壁培养诱导出神经视网膜上皮结构, 然后人工分离类视网膜结构悬浮培养, 进一步定向诱导分化得到成熟的 ROs。采用实时荧光定量 PCR 检测培养第 0、7、15、21 和 30 周标志基因的表达水平变化, 采用免疫荧光染色法检测培养第 8 天、第 15 天、第 15 周、第 21 周和第 30 周标志基因的蛋白水平变化来鉴定诱导分化进程及效果。在体移植 ROs 实验中, 首先破坏外界膜, 然后将经消化的 RO 细胞悬液从角巩膜缘注射到 *Gnat1*<sup>-/-</sup> 小鼠视网膜下腔, 细胞移植后 5 个月进行视网膜切片的免疫荧光染色检测植入细胞的存活情况、与宿主视网膜的整合以及进一步的成熟分化情况。**结果** 形态学和免疫荧光染色结果显示, 体外诱导 hiPSCs 早期形成的眼区细胞高表达神经视网膜上皮特异性标志物 PAX6 和 SOX1, 随后细胞可以表达视网膜祖细胞特异性标志物 LHX2, 集落外圈逐渐形成圆形透明马蹄状的类视网膜结构。机械分离并悬浮培养得到的 ROs 直径约为 1 mm, 类视网膜组织逐渐增厚并出现类视网膜色素上皮细胞。实时荧光定量 PCR 结果显示视网膜祖细胞标志基因 *VSX2* 表达在第 7 周即达峰值并持续高表达 ( $F = 168.30, P < 0.01$ ), 视网膜前体细胞标志基因 *RCVRN* 在第 7 周也开始出现并逐渐高表达 ( $F = 271.60, P < 0.01$ ), 感光蛋白基因 *RHO* 在第 15 周开始表达 ( $F = 95.02, P < 0.01$ ), 而成熟感光细胞标志 *OPN1LW/MW* 的表达在第 21 周明显升高 ( $F = 40.57, P < 0.01$ )。免疫荧光染色进一步检测到感光蛋白 RHO 在第 30 周达高表达状态。RO 细胞移植后 3 周, 自身带有绿色荧光的细胞成功在宿主小鼠的视网膜外核层中长期存活, 移植后 5 个月植入细胞表达功能性光信号转导蛋白 GNAT1。**结论** 体外 3D 培养诱导 hiPSCs 生成 ROs 可成功地模拟人体内视网膜的发育过程, 移植的 RO 细胞能在受体小鼠眼内长期存活, 进入外核层并进一步发育成熟为类感光细胞。

**【关键词】** 人诱导多能干细胞; 视网膜类器官; 感光细胞; 诱导分化; 在体移植

**基金项目:** 国家自然科学基金项目 (81790644)

DOI: 10.3760/cma.j.cn115989-20200331-00227

## Transplantation of retinal organoids *in vivo* and long-term survival of photoreceptor cells

Sun Xiao, Xie Haohuan, Zhang Mei, Xue Tian

Department of Ophthalmology, Life Sciences and Medicine, University of Science and Technology of China, CAS Key Laboratory of Brain Function and Disease, School of Life Sciences, University of Science and Technology of China, Hefei 230026, China

Corresponding author: Xue Tian, Email: xuetian@ustc.edu.cn

**[Abstract]** **Objective** To investigate the differentiation process of human-induced pluripotent stem cells (hiPSCs) into retinal organoids (ROs) *in vitro* and its potential application in cell transplantation, and to provide a fundamental study for stem-cell therapy. **Methods** BC1-eGFP hiPSCs were differentiated into neurospheres in directional differentiation medium via suspension culture. On day 7, hiPSCs-induced-neurospheres were seeded onto Geltrex-coated dishes to induce neural retinal (NR) domains. On day 28, the NR domains were manually detached and collected. These NRs were cultured until the maturation of ROs. The quantitative real-time PCR (at week 0, week 7, week 15, week 21 and week 30 group) and immunohistochemistry (at day 8, day 15, week 15, week 21 and week 30 group) were used to characterize the differentiation process of hiPSCs. For ROs transplantation, the ROs were digested, and the cell suspension was injected into the subretinal cavity of *Gnat1*<sup>-/-</sup> mice with the outer limiting

membrane damaged in retina. Immunohistochemistry was also used to detect the survival and integration ability of the implanted cells 5 months after transplantation. **Results** The morphology and immunofluorescence staining illustrated that the cells induced from hiPSCs highly expressed the neural-retinal-epithelial specific markers PAX6 and SOX1 in the early stage, then the cells expressed the retinal-progenitor-cell specific marker LHX2 and a transparent and horseshoe-shaped NR domain was formed at the outer region of the colony. ROs was obtained by manual isolation and suspension culture. The diameter of ROs was about 1 millimeter. The retinal-like tissue gradually became thicker, even formed retinal pigment epithelial cells. Quantitative real-time PCR results showed that the expression of retinal-progenitor marker *VSX2* peaked at week 7 and maintained its high expression thereafter ( $F = 168.30, P < 0.01$ ); the expression of retinal-precursor marker *RCVRN* also appeared at week 7 and increased thereafter ( $F = 271.60, P < 0.01$ ); the expressions of *RHO* was detected at week 15 ( $F = 95.02, P < 0.01$ ), and the expression of *OPN1LW/MW* was detected at week 21 ( $F = 40.57, P < 0.01$ ). Moreover, the expression of photoreceptor protein RHO maintained in a relatively high expression state at week 30. Three weeks after the transplantation of RO cells, cells with green fluorescence were successfully moved into the outer nuclear layer of the host retina. Four to six months after transplantation, the implanted cells expressed the functional light signal transduction protein GNAT1. **Conclusions** Transplantation of retinal organoids *in vivo* can recapitulate the development of human retina. Transplanted RO cells can effectively move into the outer nuclear layer, differentiate into photoreceptors and survive in the recipient mice's retina over several months.

**[Key words]** Human induced pluripotent stem cells; Retinal organoids; Photoreceptors; Induced differentiation; *In vivo* transplantation

**Fund program:** National Natural Science Foundation of China (81790644)

DOI: 10.3760/cma.j.cn115989-20200331-00227

胚胎干细胞 (embryonic stem cells, ESCs) 和诱导多能干细胞 (induced pluripotent stem cells, iPSCs) 技术的相继建立为各类退行性疾病提供了新的细胞替代治疗方案, 突破了细胞来源和伦理问题的局限<sup>[1-2]</sup>。研究发现, 逆转录病毒介导的 *Oct4*、*Sox2*、*Klf4* 和 *c-Myc* 4 个外源基因转入小鼠成纤维细胞可得到 iPSCs, 其在形态学、基因和蛋白表达、表观遗传修饰状态、细胞倍增能力、分化能力等方面都与 ESCs 极为相似<sup>[2]</sup>。iPSCs 可作为疾病模型, 在潜在治疗方式中有一定作用, 实现了造血干细胞、免疫细胞、心肌细胞和神经元等的体外获取, 助力细胞移植治疗; 同时, 利用 iPSCs 已成功分化出心脏、迷你肾脏和微型大脑等近似于人类器官的 3D 组织模型, 在疾病研究、药物筛选和毒理测试领域展现出强大的潜力<sup>[3]</sup>。目前, 已有多项 iPSCs 向感光细胞、视网膜色素上皮 (retinal pigment epithelium, RPE) 细胞、神经节细胞 (ganglion cell, GC) 系分化的相关研究<sup>[4-5]</sup>。有研究者提出了体外 3D 视网膜分化的方法, 使干细胞在体外自发形成符合体内发育规律的视网膜类器官 (retinal organoids, ROs)<sup>[6]</sup>。ROs 的分层情况与体内视网膜类似, 包含基本的视网膜细胞类型, 如 GCs、无长突细胞、水平细胞、双极细胞、Müller 胶质细胞和感光细胞。ROs 分化方法不断得到优化。Zhong 等<sup>[7]</sup>在体外获得具有类外段结构的成熟感光细胞, 并通过单细胞感光电生理证实小部分感光细胞存在光反应。ROs 3D 模型的建立极大地推动了视网膜

发育和疾病治疗的开展。多组学研究揭示了人胚胎视网膜与 ROs 在发育和分化过程中染色质开放和基因表达动态变化的共性和差异, 扩展了对视网膜发育过程的理解<sup>[8]</sup>。随着体细胞重编程技术与基因编辑技术不断发展, 可通过视网膜色素变性患者尿液样本建立 iPSCs, 并分化成患者特异的 ROs 用于药物筛选, 为感光细胞移植提供有用资源<sup>[9]</sup>。在人 ESCs 来源的 ROs 中采用细胞表面标记分选策略有效排除了具有成瘤风险的早期胚胎细胞, 选用特定视网膜祖细胞群体进行移植, 这些细胞可以主动调节变性和损伤微环境, 延长治疗时间, 且易于标准化和产业化, 具有广阔的临床转化前景<sup>[10]</sup>。本研究旨在探究人 iPSCs (human induced pluripotent stem cells, hiPSCs) 诱导分化成 ROs 的具体进程以及干细胞移植对视网膜退行性疾病的治疗作用。体外诱导 hiPSCs 分化得到成熟的 ROs, 并检测不同时间点 ROs 的类感光细胞结构和视网膜相关基因及蛋白表达, 以用于视觉受损小鼠的在体移植治疗, 为视网膜色素变性、年龄相关性黄斑变性等视网膜退行性疾病的细胞替代治疗提供实验基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 材料来源** BC1-eGFP hiPSCs 细胞系来自美国约翰霍普金斯大学的程临钊教授实验室, 细胞核型正常, 无污染; *Gnat1*<sup>-/-</sup>小鼠由美国约翰霍普金斯大学

医学院 King-Wai Yau 实验室赠予。

**1.1.2 主要试剂及仪器** TeSR™-E8™、Y-27632、mTeSR™1、ACCUTASE (#07920)、Dispase (#07923) (美国 Stem cell 公司); (-)-Blebbistatin、肝素、牛磺酸、视黄酸、鼠源抗 Rhodopsin 多克隆一抗 (#04886, 1:1 000) (美国 Sigma 公司); 兔源抗 PAX6 多克隆一抗 (#PRB-278P-100, 1:400, 美国 Covance 公司); 山羊源抗 SOX1 多克隆一抗 (#AF3369, 1:1 000, 美国 R&D 公司); 山羊源抗 LHX2 多克隆一抗 (#sc-19344, 1:200)、兔源抗 GNAT1 多克隆一抗 (#sc-389, 1:400) (美国 Santa Cruz 公司); DMEM/F-12、HEPES 培养基、DMEM 高糖培养基、Ham's F-12 培养基、DMEM/F12 谷氨酰胺培养基; 50 倍 B27 细胞培养添加剂、100 倍 N2 细胞培养添加剂、非必需氨基酸溶液、100 倍抗菌-抗真菌剂、GlutaMAX、Geltrex™ 基质胶试剂盒、胎牛血清、山羊抗兔 Alexa Fluor® 568 IgG 二抗 (H+L) (#A-11036, 1:1 000)、驴抗鼠 Alexa Fluor® 568 IgG 二抗 (H+L) (#A-10037, 1:1 000)、驴抗山羊 Alexa Fluor® 568 IgG 二抗 (H+L) (#A-11057, 1:1 000)、DAPI (#D1306, 1:1 000) (美国 Thermo 公司); 逆转录试剂盒 (日本 TaKaRa 公司); 实时荧光定量 PCR 试剂盒 (美国 Roche 公司)。TCS SP8 型激光扫描共焦显微镜 (德国 Leica 公司); 实时荧光定量 PCR 仪 (美国 Roche 公司)。

## 1.2 方法

**1.2.1 hiPSCs 细胞培养** BC1-eGFP hiPSCs 接种培养在 Geltrex 包被的 6 孔细胞培养板上, 使用 TeSR-E8 培养基, 置于 37℃、体积分数 5% CO<sub>2</sub> 湿化细胞培养箱中进行培养。每 4~5 天细胞增生的集落融合 70%~80%, 用 Accutase 消化酶消化成单细胞悬液, 以 1:15 的比例传代继续培养。第 1 天在 TeSR-E8 培养基添加 10 μmol/L Y-27632, 此后每天更换 TeSR-E8 培养基。

**1.2.2 视网膜祖细胞的诱导分化** 细胞单层生长融合至 90% 及以上时进行视网膜祖细胞诱导分化。第 0 天使用 Dispase 消化将 hiPSCs 集落酶解至边缘卷曲, DMEM 培养基漂洗 3 次。准备 25 cm<sup>2</sup> 的低贴敷培养瓶, 加入含 10 μmol/L (-)-Blebbistatin 的 mTeSR1 培养基。将单层生长的细胞刮下后轻轻吹打几次加入低贴敷培养瓶悬浮培养, 置于 37℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中, 以诱导神经球形成和视网膜祖细胞的发生。神经诱导培养基 (neural induction medium, NIM) 包括 DMEM/F12、质量分数 1% N2 细胞培养添加剂、1 倍 NEAA、2 μg 肝素和质量分数 1% 抗菌-抗真菌剂。神经球从第 1 天 mTeSR1/NIM 的 3:1、第 2 天的 1:1 过渡到第 3 天和第 5 天的 100% NIM 培养基。第 7 天将神经球接种到

Geltrex 包被的 35 mm 培养皿上, 加入 NIM 培养基, 密度约为 10 个/cm<sup>2</sup>, 每 3~4 天更换 NIM 培养基。第 16 天开始使用视网膜分化培养基 (retinal differentiation medium, RDM), 包含体积分数 70% DMEM、30% Ham's F-12、质量分数 2% B27 细胞培养添加剂、1 倍 NEAA 和 1% 抗菌-抗真菌剂。每 3~4 天更换 RDM 培养基。

**1.2.3 ROs 的诱导分化过程** 第 28 天集落出现特异性类神经视网膜 (neural retina, NR) 结构。倒置相差显微镜下, 用无菌钨针分离出类视网膜组织, 收集于 RDM 培养基中悬浮培养, 诱导 ROs 形成。第 42 天将 ROs 从 RDM 培养基转换至包含 1 μmol/L 视黄酸、60% DMEM、25% Ham's F-12、10% FBS、100 μmol/L 牛磺酸、2% B27 细胞培养添加剂、1 倍 NEAA、1 倍 GlutaMAX 和 1% 抗菌-抗真菌剂的视网膜成熟培养基 (retinal maturation medium, RMM) 中, 每 3~4 天更换 RMM 培养基。第 90 天后使用包含 0.5 μmol/L 视黄酸、90% DMEM/F12-GlutaMAX、10% FBS、100 μmol/L 牛磺酸、1% N2 细胞培养添加剂、1 倍 NEAA、1 倍 GlutaMAX 和 1% 抗菌-抗真菌剂的 RC1 培养基, 每周换液 2 次。

**1.2.4 Gnat1-/-小鼠的在体细胞移植** 玻璃体腔注射 100 μg/μl 神经胶质毒素 DL-α-氨基己二酸 (AAA) 特异杀伤 Müller 细胞。使用序列 5'-AAGATAGTTTGCACGAAGAG-3' 产生靶向紧密连接蛋白 1 (zonula occludens-1, ZO-1) 基因的 siRNA, 经视网膜下腔注射敲低 ZO-1 基因表达, 以破坏小鼠视网膜外界膜, 帮助移植的细胞进入视网膜外核层内。木瓜蛋白酶 37℃ 消化已分化第 241 天的 ROs, 用细胞筛过滤收集细胞, EBSS 清洗细胞后加入 inhibitor solution 和丝氨酸蛋白酶 OMI 终止消化, 300×g 离心 2 min 后, 去上清并用 PBS 重悬, 控制悬液中细胞密度为 8.0×10<sup>5</sup>/μl。腹腔内注射 Avertin (2,2,2-三溴乙醇) 麻醉剂麻醉小鼠, 阿托品滴眼液点眼, 在体视镜下用微量注射器将 RO 细胞悬液经角巩膜缘注射到 Gnat1-/-小鼠视网膜下腔, 每只眼注射 1.5 μl 细胞悬液。术后用 1 倍 P-S 双抗保持眼球湿润, 并在后续饲养饮用水中添加 200 mg/L 环孢霉素和 10 mg/L 吡喹啉。

**1.2.5 免疫荧光染色鉴定视网膜细胞分子标志物蛋白的表达** 采用免疫荧光染色法检测标志基因的蛋白水平变化, 进行细胞鉴定。取贴壁条件下培养第 8 天和第 15 天细胞, 吸去培养板内培养基, 加入质量分数 4% 多聚甲醛常温下固定 15 min; ROs 形成后第 15、21 和 30 周染色, 多聚甲醛固定 30 min 后沉糖, 脱水, 组织包埋、冷冻, 10 μm 厚切片。PBS 漂洗 3 次, 加入含

质量分数 10% 山羊血清、10% 牛血清白蛋白的 0.5% Triton 封闭液, 常温下封闭 1 h; 用此封闭溶液稀释的一抗缓慢滴加覆盖样品, 于 4 °C 冰箱孵育过夜; PBS 漂洗 3 次, PBS 稀释相应物种特异性的 Alexa Fluor-488、Alexa Fluor-546 和 Alexa Fluor-647 偶联二抗和 DAPI, 稀释比均为 1:1 000, DAPI 用于细胞核染色, 常温下孵育 1 h, PBS 漂洗 3 次, 用 PVG 封片。激光扫描共焦显微镜下观察视网膜相关基因及蛋白的表达。

**1.2.6 实时荧光定量 PCR 检测视网膜细胞分子标志物基因的表达** 采用实时荧光定量 PCR 法检测第 0、7、15、21 和 30 周标志基因的表达水平变化。Trizol 裂解组织样品并提取总 RNA, NanoDrop1000 分光光度计评估 RNA 含量和质量, 根据 Takara 逆转录试剂盒将其逆转录为 cDNA, 利用特异性引物进行扩增。*β-actin* 正向引物为 5'-CATGTACGTTGCTATCCAGGC-3', 反向引物为 5'-CTCCTTAATGTCACGCACGAT-3'; *VSX2* 正向引物为 5'-GGCGACACAGGACAATCTTTA-3', 反向引物为 5'-TTCCGGCAGCTCCGTTTTTC-3'; *RCVRN* 正向引物为 5'-CCTCTACGACGTGGACGGTAA-3', 反向引物为 5'-GTGTTTTTCATCGTCTGGAAGGA-3'; *RHO* 正向引物为 5'-ACAGGATGCAATTTGGAGGGC-3', 反向引物为 5'-GCTCATGGGCTTACACACCA-3'; *OPN1LW/MW* 正向引物为 5'-GAAGTTCAAGAAGCTGCGCC-3', 反向引物为 5'-TCTCACATTGCCAAAGGGCT-3'。根据荧光定量 PCR 试剂盒说明书加样, 扩增条件: 95 °C 预变性 30 s; 95 °C 变性 5 s, 62 °C 退火及延伸 30 s, 共 40 个循环。采用实时荧光定量 PCR 仪收集实验结果, 在第 0、7、15 和 21 周检测 *VSX2* 和 *RCVRN* mRNA 相对表达量, 在第 0、15、21 和 30 周检测 *RHO* 和 *OPN1LW/MW* mRNA 相对表达量。每个样品做 3 个复孔, 取平均值, 以 *β-actin* 为内参, 采用  $\Delta\Delta Ct$  法计算目的基因相对表达量。

### 1.3 统计学方法

采用生物统计学软件 Graph Pad Prism 7.00 进行统计分析。本研究中各测量指标的数据资料经 W 检验证实呈正态分布, 以  $\text{mean} \pm \text{SD}$  表示。第 0、7、15、21 和 30 周 ROs 的 *VSX2*、*RCVRN*、*RHO* 和 *OPN1LW/MW* mRNA 相对表达量总体差异比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 LSD-*t* 检验。P<0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 BC1-eGFP 细胞的贴壁培养及自组装

BC1-eGFP 细胞呈多角形或梭形, 细胞质饱满, 细

胞膜清晰可见并稳定表达绿色荧光蛋白 (green fluorescent protein, GFP), 细胞核呈椭圆形, 多位于细胞中央。培养后 5~7 d, 贴壁培养的单层细胞不断分裂扩增, 呈镶嵌样紧密排列并长满培养皿。当细胞融合约 90% 时, 消化刮取的细胞团块呈不定形态, 边缘卷曲, 透亮, 直径约 450  $\mu\text{m}$  为宜, 悬浮培养开始自组装成神经球。第 7 天神神经球直径为  $(220 \pm 50) \mu\text{m}$ , 内部呈灰黑色, 组织疏松, 外层透亮且较为紧致 (图 1)。

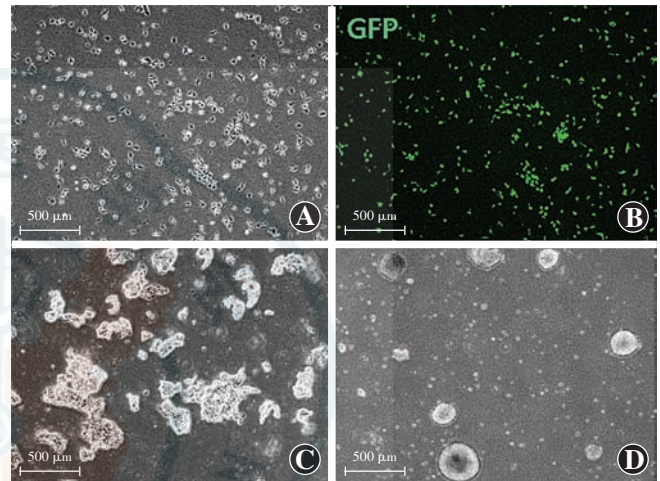


图 1 显微镜下观察体外培养的 BC1-eGFP 细胞和神经球自组装 (标尺 = 500  $\mu\text{m}$ ) A: 单层贴壁培养的 BC1-eGFP 细胞呈多角形或梭形, 细胞质饱满, 细胞膜清晰可见 B: 荧光显微镜下可见单层贴壁培养的 BC1-eGFP 细胞呈绿色荧光 (GFP) C: 悬浮培养的 BC1-eGFP 细胞团块, 直径约为 450  $\mu\text{m}$  D: 悬浮培养第 7 天细胞团块自组装成直径为  $(220 \pm 50) \mu\text{m}$  的神经球, 内部呈灰黑色, 组织疏松, 外层透亮且较为紧致 GFP: 绿色荧光蛋白

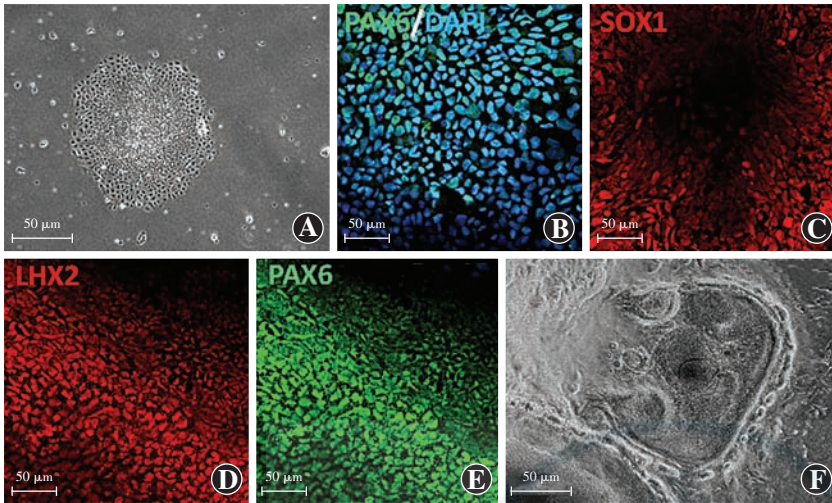
**Figure 1** *In vitro* differentiation of BC1-eGFP cells into neurospheres (bar = 500  $\mu\text{m}$ ) A: BC1-eGFP cells in monolayer adherent culture showed polygon or spindle shape B: BC1-eGFP cells expressed green fluorescence (GFP) in monolayer adherent culture C: BC1-eGFP cell clusters in suspension culture after enzymatic lysed and scraped was irregular, which were about 450  $\mu\text{m}$  in size D: BC1-eGFP cells were self-assembled into  $(220 \pm 50) \mu\text{m}$  neurospheres at day 7, showing a gray-black loose interior, and a bright and tight outer layer GFP: green fluorescent protein

### 2.2 hiPSCs 自发形成眼区并分化为 NR

对贴壁生长的集落进行免疫荧光染色, 结果显示第 8 天集落表达 *PAX6* 和 *SOX1* 的神经上皮前体细胞; 第 15 天细胞平坦并可见紧密堆积的眼区样结构域, 眼区内细胞共表达视网膜祖细胞特异性标志物 *PAX6* 和 *SOX1*; 第 28 天, 集落外圈逐渐形成圆形马蹄状的结构, 与体内 NR 形态结构十分类似 (图 2)。

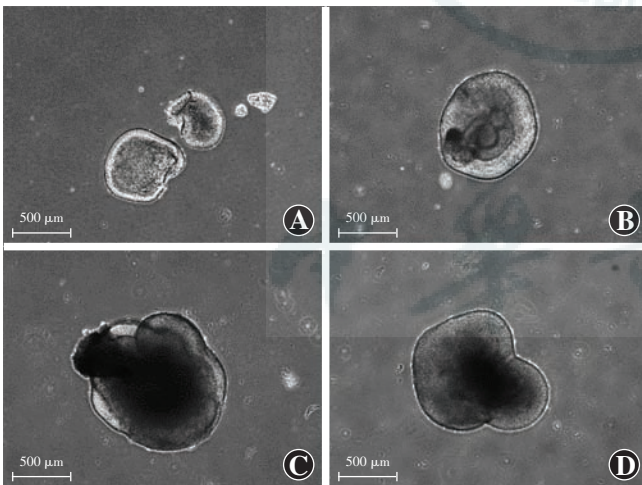
### 2.3 诱导产生神经 ROs

机械分离的 NR 视杯透明卷曲, 结构紧致。对其进行机械分离和收集, 进一步悬浮培养诱导 ROs 发生及成熟, 表现为透明 NR 组织逐渐增厚和类 RPE 细胞的出现 (图 3)。



**图 2 神经球贴壁培养诱导眼区和类视网膜结构** A: 第 8 天神神经球贴壁培养产生的圆形集落 (标尺 = 500  $\mu\text{m}$ ) B: 圆形集落内细胞 PAX6 染色阳性, 呈绿色荧光 (标尺 = 50  $\mu\text{m}$ ) C: 圆形集落外围细胞 SOX1 标记阳性, 呈红色荧光 (SOX1 为神经上皮前体细胞特异性标志物) (标尺 = 50  $\mu\text{m}$ ) D: 第 15 天的眼区细胞 LHX2 标记阳性 (标尺 = 50  $\mu\text{m}$ ) E: 第 15 天的眼区细胞 PAX6 标记阳性且与 LHX2 共定位 (PAX6 和 LHX2 为视网膜祖细胞特异性标志物) (标尺 = 50  $\mu\text{m}$ ) F: 第 28 天的集落外圈逐渐形成圆形透明马蹄状的结构, 类似于 NR (标尺 = 500  $\mu\text{m}$ )

**Figure 2 Morphology and confocal images of eye field and retina-like structure** A: Cell colony induced by adherent culture of neurospheres at day 8 (bar = 500  $\mu\text{m}$ ) B: Internal cells in colony were PAX6 positive with green fluorescence (bar = 50  $\mu\text{m}$ ) C: Peripheral cells in colony were SOX1 positive with red fluorescence (SOX1: neuroepithelial precursor cell specific marker) (bar = 50  $\mu\text{m}$ ) D: Eye field cells were LHX2 positive (red) at day 15 (bar = 50  $\mu\text{m}$ ) E: Eye field cells were PAX6 positive (green) and co-located with LHX2 (PAX6&LHX2: retinal progenitor cell specific marker) (bar = 50  $\mu\text{m}$ ) F: The periphery of colony gradually formed a transparent horseshoe-shaped retina-like structure at day 28 (bar = 500  $\mu\text{m}$ )



**图 3 光学显微镜下悬浮培养的 3D ROs 形态 (标尺 = 500  $\mu\text{m}$ )** A: 机械分离的 NR 视杯透明卷曲, 结构紧致 B: 悬浮培养 7 周的 ROs 呈球形, 外围透明, 内部呈灰黑色 C: 悬浮培养 15 周的 ROs, 透明 NR 组织逐渐增厚, 出现 RPE D: 悬浮培养 30 周的 ROs 呈不定型球状

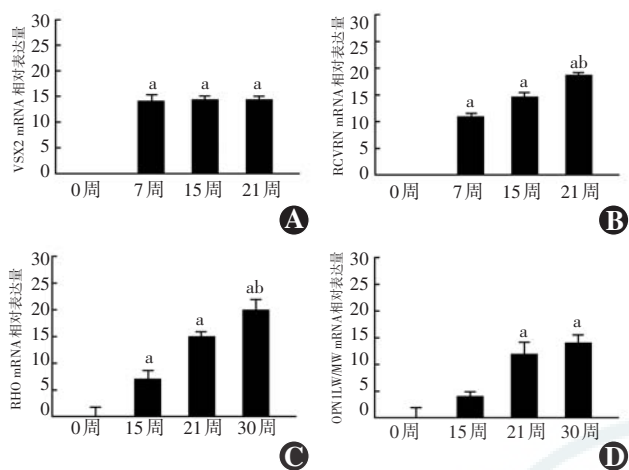
**Figure 3 Morphology of 3D retinal organoids in suspension culture** (bar = 500  $\mu\text{m}$ ) A: The mechanically isolated optic cups were transparent and curly with compact structure B: 3D ROs were spherical at week 7, and the outer part was transparent and the inner part was gray-black C: 3D ROs at week 15, NR-like tissue gradually became thicker and RPE appeared D: 3D ROs presented irregular spherical shape at week 30

培养第 0、7、15、21 周 ROs 的 VSX2 mRNA 的相对表达量分别为  $0.00 \pm 0.78$ 、 $13.95 \pm 1.37$ 、 $14.17 \pm 0.91$  和  $14.49 \pm 0.54$ , RCVRN mRNA 相对表达量分别为  $0.00 \pm 0.92$ 、 $10.79 \pm 0.75$ 、 $14.5 \pm 0.95$  和  $18.44 \pm 0.69$ , 不同时间点间总体比较差异均有统计学意义 ( $F = 168.30, P < 0.01$ ;  $F = 271.60, P < 0.01$ ), 其中 VSX2 mRNA 在第 7 周表达量即达到峰值并持续高表达, 视网膜前体细胞标志基因 RCVRN 在第 7 周也开始出现并逐渐高表达, 与培养第 0 周比较差异均有统计学意义 (均  $P < 0.05$ )。培养第 0、15、21、30 周 ROs 的 RHO mRNA 相对表达量分别为  $0.00 \pm 1.20$ 、 $6.74 \pm 1.71$ 、 $14.80 \pm 0.97$  和  $19.78 \pm 2.08$ , OPN1LW/MW mRNA 相对表达量分别为  $0.00 \pm 1.82$ 、 $3.86 \pm 1.01$ 、 $11.75 \pm 2.26$  和  $13.74 \pm 1.74$ , 不同时间点间总体比较差异均有统计学意义 ( $F = 95.02, P < 0.01$ ;  $F = 40.57, P < 0.01$ ), 其中感光蛋白基因 RHO 在第 15 周开始出现, 而成熟感光细胞标志基因 OPN1LW/MW 的表达在第 21 周开始明显升高, 培养第 21、30 周与培养第 0 周比较差异均有统计学意义 (均  $P < 0.05$ ) (图 4)。

免疫荧光染色检测结果显示, RHO 在第 21 周开始表达, 在第 30 周达到相对高表达的状态。虽然 ROs 外周没有成型的感光细胞外段, 但最边缘的突起很可能就是感光细胞早期的内段结构 (图 5)。

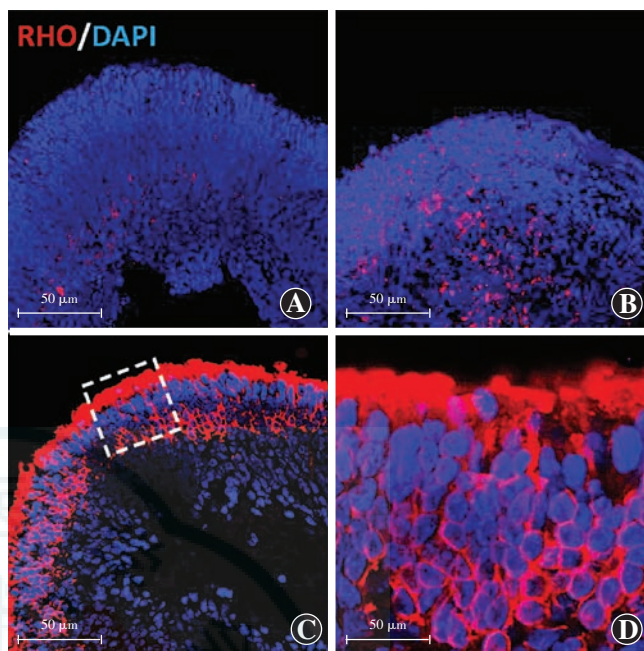
#### 2.4 *Gnat1*<sup>-/-</sup>小鼠视网膜在体移植获得新生感光细胞

将 hiPSCs 分化第 241 天的 ROs 经木瓜蛋白酶消化, 从角巩膜缘注射到 *Gnat1*<sup>-/-</sup>小鼠视网膜下腔, 经验证该小鼠视网膜中无 *Gnat1* 表达。长期饲养后进行宿主小鼠视网膜切片的免疫组织化学染色, 早期多次尝试发现, 移植的细胞被受体视网膜的外界膜阻隔在外。破坏外界膜后, RO 细胞移植第 3 周, 带有绿色荧光的细胞成功植入小鼠的视网膜中, 集中分布在外核层。移植后 5 个月, 宿主视网膜细胞及植入细胞均形态结构完整, 植入细胞稳定存活于外核层一侧, 未发生进一步整合, 且 GNAT1 与 GFP 表达完全共定位 (图 6)。



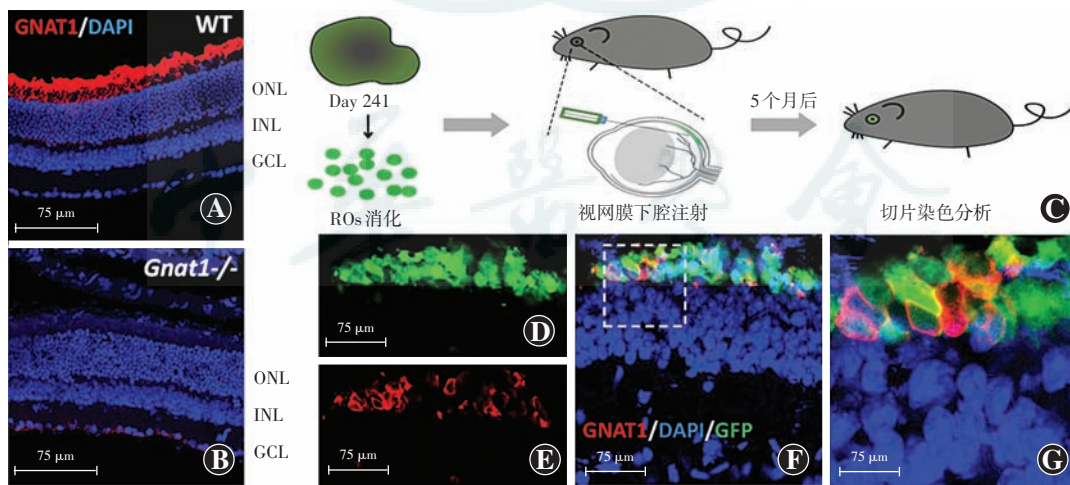
**图 4** 不同培养时间 ROs 的视网膜感光细胞分子标志物相对表达量的比较(单因素方差分析, LSD-*t* 检验,  $n=3$ ) A: 培养第 0、7、15、21 周 ROs 的 VSX2 mRNA 相对表达量比较 ( $F=168.30, P<0.01$ ) 与第 0 周比较,  $^aP<0.05$  B: 培养第 0、7、15、21 周 ROs 的 RCVRN mRNA 相对表达量比较 ( $F=271.60, P<0.01$ ) 与第 0 周比较,  $^aP<0.05$ ; 与第 15 周比较,  $^bP<0.05$  C: 培养第 0、15、21、30 周 ROs 的 RHO mRNA 相对表达量比较 ( $F=95.02, P<0.01$ ) 与第 0 周比较,  $^aP<0.05$ ; 与第 21 周比较,  $^bP<0.05$  D: 培养第 0、15、21、30 周 ROs 的 OPN1LW/MW mRNA 相对表达量比较 ( $F=40.57, P<0.01$ ) 与第 0 周比较,  $^aP<0.05$

**Figure 4 Comparison of relative expression levels of photoreceptor molecular markers in ROs at different culture time** (one-way ANOVA, LSD-*t* test,  $n=3$ ) A: Relative expression levels of VSX2 mRNA at week 0, week 7, week 15 and week 21 ( $F=168.30, P<0.01$ ) Compared with the value of week 0,  $^aP<0.05$  B: Relative expression levels of RCVRN mRNA at week 0, week 7, week 15 and week 21 ( $F=271.60, P<0.01$ ) Compared with the value of week 0,  $^aP<0.05$ ; compared with the value of week 21,  $^bP<0.05$  C: Relative expression levels of RHO mRNA at week 0, week 15, week 21 and week 30 ( $F=95.02, P<0.01$ ) Compared with the value of week 0,  $^aP<0.05$ ; compared with the value of week 21,  $^bP<0.05$  D: Relative expression levels of OPN1LW/MW mRNA at week 0, week 15, week 21 and week 30 ( $F=40.57, P<0.01$ ) Compared with the value of week 0,  $^aP<0.05$



**图 5** 不同培养时间 ROs 的 RHO 免疫荧光染色结果 A: 培养第 15 周 ROs 的细胞 RHO 标记呈阴性(标尺 = 50  $\mu\text{m}$ ) B: 培养第 21 周 ROs 的内部细胞 RHO 标记呈阳性(标尺 = 50  $\mu\text{m}$ ) C: 培养第 30 周 ROs 的外圈细胞 RHO 标记呈阳性(标尺 = 50  $\mu\text{m}$ ) D: C 图中虚线框内区域的放大图像, 培养第 30 周 ROs 的外层细胞高表达 RHO 感光蛋白(标尺 = 25  $\mu\text{m}$ )

**Figure 5 Representative immunofluorescence staining for RHO in ROs at different culture time** A: No expression of RHO was observed in ROs at week 15 (bar = 50  $\mu\text{m}$ ) B: The expression of RHO was observed in inner ROs at week 21 (bar = 50  $\mu\text{m}$ ) C: The expression of RHO was observed in outer ROs at week 30 (bar = 50  $\mu\text{m}$ ) D: Enlarged image of the dashed box area in Figure C. Peripheral cells had a high expression of RHO (bar = 25  $\mu\text{m}$ )



**图 6** *Gnat1*<sup>-/-</sup>小鼠的 RO 细胞移植实验结果 A: WT 小鼠视网膜切片的 GNAT1 染色结果(标尺 = 75  $\mu\text{m}$ ) B: *Gnat1*<sup>-/-</sup>小鼠视网膜切片的 GNAT1 染色结果(标尺 = 75  $\mu\text{m}$ ) C: RO 细胞的在体移植实验流程图 D: 宿主小鼠视网膜外核层部分细胞有 GFP 标记, 移植细胞在宿主视网膜中存活(标尺 = 25  $\mu\text{m}$ ) E: 宿主小鼠视网膜外核层部分细胞有 GNAT1 阳性, RO 细胞进一步分化为感光细胞(标尺 = 25  $\mu\text{m}$ ) F: 经 RO 细胞移植后的 *Gnat1*<sup>-/-</sup>小鼠视网膜切片免疫荧光染色结果 宿主视网膜外核层部分细胞有 GFP 和 GNAT1 标记(标尺 = 25  $\mu\text{m}$ ) G: D 图中虚线框内区域的放大图像(标尺 = 10  $\mu\text{m}$ ) 注: ONL: 外核层; INL: 内核层; GCL: 神经节细胞层; ROs: 视网膜类器官 GFP: 绿色荧光蛋白

**Figure 6 Transplantation of retinal organoids cells in *Gnat1*<sup>-/-</sup> mice** A: Immunofluorescence staining result for GNAT1 in WT mouse retina (bar = 75  $\mu\text{m}$ ) B: Immunofluorescence staining result for GNAT1 in *Gnat1*<sup>-/-</sup> mouse retina (bar = 75  $\mu\text{m}$ ) C: Diagram of the subretinal transplantation. Scheme of time points for ROs cells injection and histology analysis D: GFP<sup>+</sup> cells were observed in the host retina's ONL, and transplanted cells were survived in the host retina (bar = 25  $\mu\text{m}$ ) E: GNAT<sup>+</sup> cells were observed in the host retina's ONL (bar = 25  $\mu\text{m}$ ) F: Immunofluorescence staining result for GNAT1 in *Gnat1*<sup>-/-</sup> mouse retina after transplantation. Some GFP<sup>+</sup> and GNAT<sup>+</sup> cells were found in the host retina's ONL (bar = 25  $\mu\text{m}$ ) G: Enlarged image of the dashed box area in Figure D (bar = 10  $\mu\text{m}$ ) Note: ONL: outer nuclear layer; INL: inner nuclear layer; GCL: ganglion cell layer; ROs: retinal organoids GFP: green fluorescent protein

### 3 讨论

视网膜退行性疾病,如视网膜色素变性和年龄相关性黄斑变性等均会导致视觉相关细胞发生不可逆的变性、坏死,但其神经环路尚存<sup>[11-12]</sup>。视网膜的再生修复能力有限,无法完成感光细胞的自我补充和功能修复。因此,外源性感光细胞移植替代治疗是重建患者视功能的关键。移植后细胞要发挥治疗作用,必须能够以足够数量整合到宿主视网膜中,替代原本宿主视网膜中变性、坏死或功能异常的细胞,并成功建立新的突触连接。在这个过程中,移植细胞的成功整合及高的整合效率是关键。近年来多项关于移植小鼠视网膜前体细胞进行视觉修复的研究被报道,虽然尚未涉及临床治疗领域,但是相关的动物实验研究已经证实,在疾病晚期,移植的细胞有可能部分整合入宿主视网膜,取代垂死的感光细胞,且表现出一定的感光功能<sup>[13-16]</sup>。然而,用于移植的最佳细胞来源仍然是目前细胞替代治疗的主要难题之一。

本研究中采用悬浮培养的方法体外诱导 hiPSCs 自发分化成 3D ROs,具有与人类视网膜发育类似的时空特征<sup>[7]</sup>。悬浮培养的 ROs 早期表达视网膜祖细胞特异性标志因子 *VSX2*,在第 7 周时可检测到感光细胞特异标志物 *RCVRN* 的阳性表达,最终产生成熟类感光细胞,并显著表达感光蛋白 *RHO*。目前,类感光细胞缺乏功能性外段结构,可能的原因是缺少体内复杂生理环境和与 RPE 的相互作用。RPE 细胞位于视网膜感光细胞胞外段和脉络膜之间,不仅持续提供微环境、更新外段,还在重新异构全反式视黄醛和维持感光细胞兴奋性方面起着重要作用,对于感光细胞发育出外段结构具有重要作用<sup>[17-18]</sup>。在诱导分化过程中,我们发现部分 ROs 上联结着一团自发形成的 RPE 球,在其交界处可观察到类似感光细胞外段的长条放射状结构。因此,希望后续实验通过 ROs 与 RPE 细胞的共培养,获得具有成熟细胞外段的感光细胞。

在体移植时,我们将 RO 细胞悬液注射入 *Gnat1*<sup>-/-</sup>小鼠的视网膜下腔,根据 qPCR 和免疫组织化学的结果来看,在长达 200 余天的分化后,感光细胞的特异基因表达显著增加,相关功能蛋白 *RHO* 也达到高表达状态且阳性细胞占比很大,因此推测 ROs 消化的细胞悬液多为类感光细胞前体细胞。移植进入的细胞群究竟为何种类型的细胞、处于何种特化阶段,这不但影响移植整合效率,更与移植的安全性密切相关。另外,由于外界膜的阻挡干细胞难以与宿主视网膜整合或移行至靶位置。外界膜是视网膜上感光细胞内段和 Müller

细胞顶突通过紧密连结蛋白 ZO-1 连结形成的膜结构<sup>[19]</sup>。参照文献[20-21],我们利用药物 AAA 对 Müller 细胞的特异毒性,以及使用 siRNA 对 *ZO-1* 进行敲低,可以成功破坏外界膜,帮助移植的细胞进入视网膜外核层内,效果显著。植入的 RO 细胞不仅能进入外核层,还能在受体小鼠眼内长期存活,表达转导蛋白 *GNAT1*,进一步发育成熟为类感光细胞。最近的研究表明,大多数预测整合的感光细胞是细胞之间发生胞质交换的结果。本研究中染色结果显示,宿主小鼠视网膜细胞和植入细胞均形态结构完好;植入的细胞群体集中存活于宿主视网膜外核层一侧,并没有进入外核层或整合的迹象;最关键的是,宿主自身细胞完全不表达 *Gnat1*,未观察到明显 GFP<sup>+</sup>/*GNAT1*-或 GFP<sup>-</sup>/*GNAT1*+ 细胞<sup>[22-23]</sup>,因此本研究推断表达转导蛋白 *GNAT1* 的细胞是由稳定存活的植入细胞继续分化成熟形成,而非胞质交换的结果,进一步证明在体移植实验可以有效保证植入的 RO 细胞稳定长期存活并继续发育成熟(图 7)。目前,用于移植的各类干细胞多来自自体,易引起免疫排斥反应,故在对 *Gnat1*<sup>-/-</sup>小鼠进行细胞移植操作后,在小鼠饮用水中添加免疫抑制剂环孢霉素和吡喹酮以缓解小鼠排异反应。临床试验中,hiPSCs 取材于患者自身体细胞,很大程度上克服了移植后的免疫排斥反应和伦理问题。

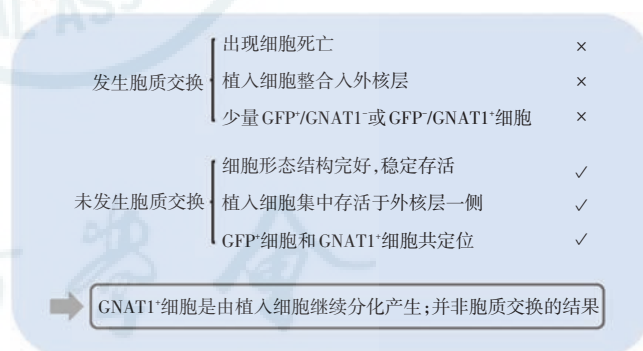


图 7 *Gnat1*<sup>-/-</sup>小鼠经 RO 细胞移植后 *GNAT1* 阳性细胞来源分析  
GFP: 绿色荧光蛋白

Figure 7 Analysis of the source of *GNAT1* positive cells in *Gnat1*<sup>-/-</sup> mouse retina after RO cells transplantation GFP: green fluorescent protein

综上所述,本研究成功通过 3D 培养体外诱导 hiPSCs 分化成 ROs,模拟了整个人类视网膜的发育过程,发育前期开始并稳定表达视网膜祖细胞特异性标志物 *VSX2*,后期 ROs 外周可以明确检测到功能性感光蛋白 *RHO* 的阳性表达。本研究中成功地将 hiPSCs 诱导成富集视网膜感光细胞前体细胞的类视网膜结构,

可用于视觉受损小鼠的在体移植治疗。本研究的诱导分化方式和在体移植尝试非常适用于维持感光细胞的稳定长期存活和进一步的分化成熟,为视网膜色素变性、年龄相关性黄斑变性等视网膜退行性疾病的移植治疗提供了基础。遗憾的是,移植的干细胞缺乏神经轴突导向性生长的能力,导致无法与脑部建立功能性连接,视觉功能恢复受阻,这是视觉损伤干细胞治疗中最为复杂的环节。造成这一结果的原因可能是:(1)移植的细胞数量不够,存活及准确进入外核层的细胞较少,不足以发生进一步的神经元整合;(2)移植手术方法有待改进,将细胞悬液直接注入视网膜下腔的移植方法虽然简便易行,但干细胞同时失去了维系其生存的微环境;(3)移植治疗的最适细胞类群仍需进一步探索,可能表达特异性标志物的视网膜前体细胞更适合在体视网膜移植。我们将进一步优化诱导分化方法和在体移植技术,检测干细胞的功能整合效率,并利用瞳孔对光反射、视动反应等行为学实验确定干细胞移植对 *Gnat-/-* 小鼠的视觉修复效果。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

## 参考文献

- [1] Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos [J]. *Nature*, 1981, 292 (5819) : 154-156. DOI: 10.1038/292154a0.
- [2] Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors [J]. *Cell*, 2006, 126 (4) : 663-676. DOI: 10.1016/j.cell.2006.07.024.
- [3] Ebert AD, Liang P, Wu JC. Induced pluripotent stem cells as a disease modeling and drug screening platform [J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2012, 60 (4) : 408-416. DOI: 10.1097/FJC.0b013e318247f642.
- [4] 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.
- [5] Pouya A, Satarian L, Kiani S, et al. Human induced pluripotent stem cells differentiation into oligodendrocyte progenitors and transplantation in a rat model of optic chiasm demyelination [J/OL]. *PLoS One*, 2011, 6 (11) : e27925 [2020-01-21]. <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0027925>. DOI: 10.1371/journal.pone.0027925.
- [6] 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.
- [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 [2020-01-20]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4370190/>. DOI: 10.1038/ncomms5047.
- [8] Xie H, Zhang W, Zhang M, et al. Chromatin accessibility analysis reveals regulatory dynamics of developing human retina and hiPSC-derived retinal organoids [J/OL]. *Sci Adv*, 2020, 6 (6) : eaay5247 [2020-01-21]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7007246/>. DOI: 10.1126/sciadv.aay5247.
- [9] Deng WL, Gao ML, Lei XL, et al. Gene correction reverses ciliopathy and photoreceptor loss in iPSC-derived retinal organoids from retinitis pigmentosa patients [J]. *Stem Cell Reports*, 2018, 10 (4) : 1267-1281. DOI: 10.1016/j.stemcr.2018.02.003.
- [10] Zou T, Gao L, Zeng Y, et al. Organoid-derived C-Kit+/SSEA4- human retinal progenitor cells promote a protective retinal microenvironment during transplantation in rodents [J/OL]. *Nat Commun*, 2019, 10 (1) : 1205 [2020-03-15]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6418223/>. DOI: 10.1038/s41467-019-08961-0.
- [11] Hartong DT, Berson EL, Dryja TP. Retinitis pigmentosa [J]. *Lancet*, 2006, 368 (9549) : 1795-1809. DOI: 10.1016/S0140-6736(06)69740-7.
- [12] Hamel CP. Cone rod dystrophies [J/OL]. *Orphanet J Rare Dis*, 2007, 2 (1) : 7 [2020-01-21]. <https://ojrd.biomedcentral.com/articles/10.1186/1750-1172-2-7>. DOI: 10.1186/1750-1172-2-7.
- [13] 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.
- [14] Chacko DM, Rogers JA, Turner JE, et al. Survival and differentiation of cultured retinal progenitors transplanted in the subretinal space of the rat [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000, 268 (3) : 842-846. DOI: 10.1006/bbrc.2000.2153.
- [15] Eberle D, Santos-Ferreira T, Grahl S, et al. Subretinal transplantation of MACS purified photoreceptor precursor cells into the adult mouse retina [J/OL]. *J Vis Exp*, 2014, (84) : e50932 [2020-03-15]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4130385/>. DOI: 10.3791/50932.
- [16] Suzuki T, Oochi K, Hakeda-Suzuki S, et al. Transplantation of photoreceptor precursor cells into the retina of an adult *Drosophila* [J]. *Dev Growth Differ*, 2018, 60 (7) : 442-453. DOI: 10.1111/dgd.12545.
- [17] Akhtar T, Xie H, Khan MI, et al. Accelerated photoreceptor differentiation of hiPSC-derived retinal organoids by contact co-culture with retinal pigment epithelium [J/OL]. *Stem Cell Res*, 2019, 39 : 101491 [2020-03-16]. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1873506119301217?via%3Dihub>. DOI: 10.1016/j.scr.2019.101491.
- [18] Marmorstein AD. The polarity of the retinal pigment epithelium [J]. *Traffic*, 2001, 2 (12) : 867-872. DOI: 10.1034/j.1600-0854.2001.21202.x.
- [19] MacLaren RE. Development and role of retinal glia in regeneration of ganglion cells following retinal injury [J]. *Br J Ophthalmol*, 1996, 80 (5) : 458-464. DOI: 10.1136/bjo.80.5.458.
- [20] West EL, Pearson RA, Tschernutter M, et al. Pharmacological disruption of the outer limiting membrane leads to increased retinal integration of transplanted photoreceptor precursors [J]. *Exp Eye Res*, 2008, 86 (4) : 601-611. DOI: 10.1016/j.exer.2008.01.004.
- [21] Pearson RA, Barber AC, West EL, et al. Targeted disruption of outer limiting membrane junctional proteins (Crb1 and ZO-1) increases integration of transplanted photoreceptor precursors into the adult wild-type and degenerating retina [J]. *Cell Transplant*, 2010, 19 (4) : 487-503. DOI: 10.3727/096368909X486057.
- [22] 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 [2020-03-16]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5059468/>. DOI: 10.1038/ncomms13029.
- [23] Santos-Ferreira T, Llonch S, Borsch O, et al. Retinal transplantation of photoreceptors results in donor-host cytoplasmic exchange [J/OL]. *Nat Commun*, 2016, 7 : 13028 [2020-03-16]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5059459/>. DOI: 10.1038/ncomms13028.

(收稿日期:2020-06-17 修回日期:2020-09-08)

(本文编辑:刘艳)