

· 专家述评 ·

# 晶状体类器官培养技术的发展与挑战

傅秋黎 姚克

浙江大学眼科医院 浙江大学医学院附属第二医院眼科中心, 杭州 310009

通信作者: 姚克, Email: xlren@zju.edu.cn

**【摘要】** 类器官培养技术是目前干细胞领域的研究热点,即在体外培养与体内器官高度相似的,具有立体结构与生理功能的器官样细胞群。目前,利用人源性多能干细胞培养人晶状体类器官,即晶状体小体的构建已经实现并在不断地演进,双凸透明、具备天然晶状体所有组分以及屈光性能的晶状体类器官作为一种可靠的人晶状体体外模型,在研究晶状体发育机制上优势显著,在此基础上建立的年龄相关性白内障和先天性白内障的体外疾病模型,更为白内障的病理机制研究、潜在药物筛选带来了极大的便利性与可靠性,在白内障基础研究乃至临床转化上具有广阔的前景。

**【关键词】** 晶状体小体; 晶状体; 类器官; 干细胞; 白内障

**基金项目:** 国家自然科学基金项目 (81670833、81870641); 浙江省重点研发项目 (2019C03091); 中央高校基本科研业务费与专项资金资助基础研究基金项目 (2019QNA7026)

DOI:10.3760/cma.j.cn115989-20220114-00015

## Development and challenge of human lentoid bodies generation

Fu Qiuli, Yao Ke

Eye Center, Second Affiliated Hospital of Zhejiang University School of Medicine, Zhejiang University Eye Hospital, Hangzhou 310009, China

Corresponding author: Yao Ke, Email: xlren@zju.edu.cn

**[Abstract]** Organoid is one of the hottest areas of research in the field of stem cells, which is an organ in a dish with three-dimensional structure and physiological functions that are highly similar to organs *in vivo*. At present, the generation methods of lens organoids, namely the lentoid bodies, have been established and continuously developed. The double-convex transparent lentoid bodies, with refractive function and all microscopic components of natural lenses, act as reliable *in vitro* models of human lenses and provide convenience for studying the mechanism of lens development. Moreover, the establishment of age-related cataract and congenital cataract models based on the lentoid bodies also provides great convenience and reliability for the study of pathological mechanism of cataract and drug screening, showing broad prospects in basic research and even clinical transformation for cataract.

**[Key words]** Lentoid bodies; Lens; Organoids; Stem cells; Cataract

**Fund program:** National Natural Science Foundation of China (81670833, 81870641); Zhejiang Province Key Research and Development Program (2019C03091); The Fundamental Research Funds for the Central Universities (2019QNA7026)

DOI:10.3760/cma.j.cn115989-20220114-00015

白内障是由老化、遗传、外伤等各种原因引起的晶状体蛋白变性聚集、晶状体混浊而导致视力障碍的眼科疾病,也是全球首要的致盲眼病<sup>[1]</sup>。目前,利用人类晶状体上皮细胞(lens epithelial cells, LECs)构建的二维模型是研究白内障最常用的体外模型。近年来随着干细胞技术和再生医学的突飞猛进,利用干细胞培养类器官进而构建疾病模型已成为兼具科研价值与临

床前景的研究热点,在2021年类器官更是被列为“十四五”国家重点研发计划重点专项。类器官是在体外培养构建的与人体组织器官具有一致的宏观及微观三维结构,甚至具备相应生理功能的简化版器官<sup>[2]</sup>,其可以模拟体内真实器官的结构与功能,为精准医疗提供了全新的研究方法与治疗手段。类器官的培养一般来源于组织中的成体干细胞,或是具有广泛分化潜能

的多能干细胞(pluripotent stem cells, PSCs), PSCs 又包括胚胎干细胞(embryonic stem cells, ESCs)和诱导多能干细胞(induced pluripotent stem cells, iPSCs)。这些具备自我更新和定向分化能力的细胞可以在特定的培养条件下自我生长并组装成具有精密排列规律和空间结构的类器官。长期以来,研究者在不断探索的过程中已通过不同细胞来源和培养方法成功于体外构建出多种再生晶状体,也称为晶状体小体(lentoid bodies, LBs)。

## 1 干细胞在晶状体再生中的作用

研究者们最早观察到的晶状体再生现象来自于以蝾螈为代表的低等两栖动物。蝾螈可以在晶状体摘除后通过背侧虹膜色素上皮细胞的转分化实现晶状体的再生,这一过程也可以通过体外培养蝾螈虹膜色素上皮细胞实现<sup>[3]</sup>。不同于具备强大再生能力的两栖动物,目前发现的哺乳动物中晶状体的再生现象均依赖于结构相对健全、完整、无粘连折叠的晶状体囊膜,这是由于晶状体的前囊膜及赤道部囊膜上排布的 LECs 中夹杂有可以定向分化为 LECs 的成体干细胞,即晶状体干细胞。早期研究发现在摘除兔、小鼠和大鼠的晶状体后,囊膜上残留的晶状体干细胞均可生长出晶状体样组织,但其完整性和透明性欠佳<sup>[4]</sup>。而在体外培养兔、小鼠以及人类 LECs 的过程中也可通过与晶状体囊膜、玻璃体、睫状体中成纤维细胞的共培养得到具有三维结构的晶状体样组织,并且其中一些已经拥有一定的透明性及光学特性,且可从中检测到包括  $\alpha A$ 、 $\alpha B$ 、 $\beta$  和  $\gamma$ -crystallin 在内的多种晶状体特异性标志物<sup>[5-6]</sup>。此后我国中山眼科中心研究团队为了尽可能保存晶状体囊膜上具有再生潜力的干细胞,缩小了撕囊口并将其移至囊膜周边部,采用该术式吸除晶状体的兔、食蟹猴甚至是儿童白内障患者均实现了术后透明晶状体组织的再生<sup>[7]</sup>,虽然该方法并不适用于细胞增生水平较弱的成年个体以及存在遗传突变的先天性白内障患儿,距离临床应用还有很多亟待解决的问题,但其有力地印证了存在大量具备强大增生潜能的干细胞是实现晶状体再生的首要生物学基础。

## 2 利用 PSCs 体外构建 LBs

相较于只能定向分化且难以从体内分离获取的晶状体干细胞,人源性 ESCs 和 iPSCs 具有在体外无限增生、可分化为三胚层中不同组织细胞的能力,目前被广泛应用于各发育时期各类细胞的分化培养以及三维类器官的体外构建。在眼科领域,利用 PSCs 在体外培

养视网膜类器官和角膜类器官已经初步实现,其中角膜类器官具有角膜发育中同样的特征并表现为上皮、基质和内皮 3 层结构<sup>[8]</sup>;视网膜类器官在诱导分化过程中经历了胚胎眼发育的各阶段,拥有视网膜组织中所有细胞类型并可呈现分层结构<sup>[9]</sup>。2010 年, Yang 等<sup>[10]</sup>通过调控在晶状体发育过程中极为重要的成纤维细胞生长因子(fibroblast growth factor, FGF)、转化生长因子- $\beta$ (transforming growth factor- $\beta$ , TGF- $\beta$ )和 Wnt 通路,创建了三阶段培养法,开创性地将人 ESCs 分化培养为具有三维结构的 LBs,该方法也成为未来晶状体体外培养新方法衍生迭代的技术基础。随后 Qiu 等<sup>[11]</sup>于 2012 年将年龄相关性白内障患者的 LECs 重编程去分化为 iPSCs,并在体外经过三阶段培养将其诱导为 LBs,为人类自体来源的 iPSCs 体外诱导 LBs 开创了先河。本研究团队于 2017 年探索出一种晶状体类器官构建新方法——“荷包蛋法”,将人尿源性诱导多能干细胞(urinary human induced pluripotent stem cells, UiPSCs)通过三阶段培养,早期机械筛选,在分化过程中出现“荷包蛋样”细胞结构,最终在第 25 天时发育为成熟透明的 LBs<sup>[12]</sup>。该再生晶状体直径已达到目前已知最大的 3 mm,包含正常晶状体拥有的所有结构,同时可以实现 1.73 倍左右的放大率。而 Murphy 等<sup>[13]</sup>在分化过程中通过识别 LECs 的特异性抗原对细胞进行筛选,为 LBs 的体外大规模构建提供了一种简单有效的方法。2020 年, Ali 等<sup>[14-15]</sup>借助“荷包蛋法”将人外周血单核细胞来源的 iPSCs 培养成 LBs,并通过对人 ESCs 和 iPSCs 来源的 LBs 转录组和蛋白质组进行分析,发现两者表达谱系高度重叠且与正常晶状体一致,证明 2 种干细胞来源的再生晶状体诱导方法等效且可靠,展现出良好的应用前景。

## 3 利用晶状体类器官构建体外研究模型

人晶状体类器官的体外诱导过程模拟了人胚胎晶状体的发育历程,在分化过程中相应时间可检测到与发育过程一致的特异性晶状体基板标志物、早期晶状体标志物和纤维细胞标志物的表达<sup>[12]</sup>。本研究团队在通过“荷包蛋法”诱导 LBs 的过程中发现一长链非编码 RNA:lncRNA ALB,它可以通过调节自噬标记物 LC3B 活化而调控自噬过程,影响细胞核、细胞器的退化及代谢废物的及时清除,从而在人晶状体正常发育过程及透明性维持中发挥作用<sup>[16]</sup>。考虑到 LBs 诱导分化的过程本身即可作为一个发育学模型,我们相信未来大量关于晶状体发育机制的基础研究可以借助于该体外模型相对便捷而直观地开展。

稳定可靠的疾病模型是研究白内障发病机制、病理生理特点及治疗手段的必要基础。本研究团队已经利用 UiPSCs 来源的 LBs 构建出包括年龄相关性白内障和先天性白内障在内的体外疾病模型<sup>[17-18]</sup>。本研究团队发现 LBs 培养成熟后会随着时间推移逐渐丧失透明性,并且这一混浊过程会因过氧化氢暴露而加速,同时还从中检测到了白内障进展过程中至关重要的晶状体蛋白聚集以及自噬活性的改变,这表明本研究团队借助过氧化氢处理 LBs,在世界上首次体外构建了人源性年龄相关性白内障疾病模型<sup>[17]</sup>。同时为了构建先天性白内障体外模型,本研究团队将 2 个带有不同先天性白内障基因突变遗传家系的 UiPSCs 诱导分化成 LBs,发现患者来源的 LBs 均出现明显混浊,且其混浊程度和形态特征与患者白内障的外观和分型高度一致,LBs 分化过程也与患者的病程特征十分相似,这表明本研究团队首次构建出了可高度反映患者遗传背景与疾病特征的先天性白内障体外模型<sup>[18]</sup>。

体外疾病模型的建立不仅会推动白内障病理机制研究的进一步发展,还可以为白内障的药物研发和筛选提供可靠的实验平台。目前包括羊毛甾醇在内的化合物已被报道可以在二维细胞模型和动物模型上通过阻止晶状体蛋白异常聚集发挥疗效<sup>[19-20]</sup>;但这些药物的稳定性和有效性仍需更可靠的人源性疾病模型验证,研究者若能借助 LBs 白内障体外模型筛选出具有明确疗效的白内障新药,将大大有助于降低诊疗费用、提供早期治疗机会、避免手术创伤和并发症,切实地造福于患者。

将 LBs 作为白内障致病机制研究和候选药物评估的体外模型,相对于以往传统的细胞和动物模型而言具有不可替代的优势:相较于氧化性药物和紫外线辐照诱导的白内障动物模型可以避免全身毒性的干扰以及物种异质性的影响;相较于人 LECs 细胞模型可以模拟人类晶状体的形态结构特征和微环境中各组分的相互作用,从而获得更真实、更接近在体状态的实验结果。我们期待更多的中国研究者可以借助先进的 LBs 模型开展实验,以期进一步探明白内障的发病机制及药物靶点。

#### 4 展望

白内障的发病机制十分复杂,药物研发也仍存在很大的空白,未来,我国的眼科研究者需要在加深对人晶状体发育和再生的分子机制认识的基础上不懈推进 LBs 构建方法的演进和迭代。正常成年人类晶状体的直径为 9 mm,目前培养出最大的 LBs 的直径仅为

3 mm<sup>[12]</sup>。因此提升 LBs 相对于正常晶状体形态和功能的一致性仍是下一阶段研究的重要任务。另一方面,随着再生医学和干细胞疗法的飞速进步,人 PSCs 来源的视网膜色素上皮细胞移植治疗年龄相关性黄斑变性的临床试验已经开展<sup>[21]</sup>,而利用 PSCs 诱导 LBs 植入眼内替代混浊的晶状体,作为一种值得探索的白内障新疗法,其可行性目前仍有诸多难点需要解决,这或许需要借助多学科交叉融合,利用生物材料和组织工程技术研发细胞支架和载体,从而支撑并引导干细胞增生分化为理想的三维结构;同时也需要眼科研究者对调控晶状体再生的信号通路和干细胞微环境进行更加深入细致的探索,培养出标准化且具备屈光性能的再生晶状体,推进晶状体类器官治疗白内障早日实现临床转化。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

#### 参考文献

- [1] Liu YC, Wilkins M, Kim T, et al. Cataracts [J]. *Lancet*, 2017, 390(10094): 600-612. DOI: 10.1016/S0140-6736(17)30544-5.
- [2] 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): eaaf9414 [2021-12-01]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28104841>. DOI: 10.1126/science.aaf9414.
- [3] Tsonis PA, Madhavan M, Tancous EE, et al. A newt's eye view of lens regeneration [J]. *Int J Dev Biol*, 2004, 48(8-9): 975-980. DOI: 10.1387/ijdb.041867pt.
- [4] Gwon A. Lens regeneration in mammals: a review [J]. *Surv Ophthalmol*, 2006, 51(1): 51-62. DOI: 10.1016/j.survophthal.2005.11.005.
- [5] Nagineni CN, Bhat SP. Lens fiber cell differentiation and expression of crystallins in co-cultures of human fetal lens epithelial cells and fibroblasts [J]. *Exp Eye Res*, 1992, 54(2): 193-200. DOI: 10.1016/S0014-4835(05)80208-8.
- [6] O'Connor MD, McAvoy JW. *In vitro* generation of functional lens-like structures with relevance to age-related nuclear cataract [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2007, 48(3): 1245-1252. DOI: 10.1167/iovs.06-0949.
- [7] Lin H, Ouyang H, Zhu J, et al. Lens regeneration using endogenous stem cells with gain of visual function [J]. *Nature*, 2016, 531(7594): 323-328. DOI: 10.1038/nature17181.
- [8] Foster JW, Wahlin K, Adams SM, et al. Cornea organoids from human induced pluripotent stem cells [J/OL]. *Sci Rep*, 2017, 7: 41286 [2021-12-06]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28128337>. DOI: 10.1038/srep41286.
- [9] 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.
- [10] Yang C, Yang Y, Brennan L, et al. Efficient generation of lens progenitor cells and lentoid bodies from human embryonic stem cells in chemically defined conditions [J]. *FASEB J*, 2010, 24(9): 3274-3283. DOI: 10.1096/fj.10-157255.
- [11] Qiu X, Yang J, Liu T, et al. Efficient generation of lens progenitor cells from cataract patient-specific induced pluripotent stem cells [J/OL]. *PLoS One*, 2012, 7(3): e32612 [2021-12-08]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22403680>. DOI: 10.1371/journal.pone.0032612.
- [12] Fu Q, Qin Z, Jin X, et al. Generation of functional lentoid bodies from human induced pluripotent stem cells derived from urinary cells [J].

- Invest Ophthalmol Vis Sci, 2017, 58 (1) : 517-527. DOI: 10. 1167/ iovs. 16-20504.
- [13] Murphy P, Kabir MH, Srivastava T, et al. Light-focusing human micro-lenses generated from pluripotent stem cells model lens development and drug-induced cataract *in vitro* [J/OL]. Development, 2018, 145(1) : dev155838 [2021-12-15]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29217756>. DOI: 10. 1242/dev. 155838.
- [14] Ali M, Kabir F, Raskar S, et al. Generation and proteome profiling of PBMC-originated, iPSC-derived lentoid bodies [J/OL]. Stem Cell Res, 2020, 46 : 101813 [2021-12-15]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32474394>. DOI: 10. 1016/j. scr. 2020. 101813.
- [15] Ali M, Kabir F, Thomson JJ, et al. Comparative transcriptome analysis of hESC-and iPSC-derived lentoid bodies [J/OL]. Sci Rep, 2019, 9(1) : 18552 [2021-12-15]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31811247>. DOI: 10. 1038/s41598-019-54258-z.
- [16] Fu Q, Qin Z, Zhang L, et al. A new long noncoding RNA ALB regulates autophagy by enhancing the transformation of LC3BI to LC3BII during human lens development [J]. Mol Ther Nucleic Acids, 2017, 9 : 207-217. DOI: 10. 1016/j. omt. 2017. 09. 011.
- [17] Qin Z, Zhang L, Lyu D, et al. Opacification of lentoid bodies derived from human induced pluripotent stem cells is accelerated by hydrogen peroxide and involves protein aggregation [J/OL]. J Cell Physiol, 2019, 234(12) : 23750-23762 [2021-12-30]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31180584>. DOI: 10. 1002/jcp. 28943.
- [18] Lyu D, Zhang L, Qin Z, et al. Modeling congenital cataract *in vitro* using patient-specific induced pluripotent stem cells [J/OL]. NPJ Regen Med, 2021, 6(1) : 60 [2021-12-30]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/34599192>. DOI: 10. 1038/s41536-021-00171-x.
- [19] Zhao L, Chen XJ, Zhu J, et al. Lanosterol reverses protein aggregation in cataracts [J]. Nature, 2015, 523 (7562) : 607-611. DOI: 10. 1038/nature14650.
- [20] Makley LN, McMenimen KA, DeVree BT, et al. Pharmacological chaperone for  $\alpha$ -crystallin partially restores transparency in cataract models [J]. Science, 2015, 350 (6261) : 674-677. DOI: 10. 1126/science. aac9145.
- [21] Mandai M, Watanabe A, Kurimoto Y, et al. Autologous induced stem-cell-derived retinal cells for macular degeneration [J]. N Engl J Med, 2017, 376(11) : 1038-1046. DOI: 10. 1056/NEJMoa1608368.

(收稿日期:2022-01-14 修回日期:2022-02-16)

(本文编辑:张宇)

读者·作者·编者

## 本刊对中英文摘要的要求

论著或综述文稿正文请撰写中英文摘要。原创性论著文稿要求为结构性摘要,包括背景(Background)、目的(Objective)、方法(Methods)、结果(Results)和结论(Conclusions) 5 个要素,摘要应能够回答以下问题:(1)为什么进行这项研究。(2)主要用什么方法进行研究。(3)获得什么主要结果。(4)通过研究得出什么结论等。其中背景部分请概括本课题所涉及的研究内容及亟待解决的问题。目的部分为本课题对上述提出问题设立的目标。方法部分应提供研究对象、样本量、分组情况、各组的干预情况、与研究相适应的观察或检测指标,获得结局指标的手段和设备等。临床研究请说明是前瞻性研究、回顾性研究还是观察性研究。结果部分请客观描述研究的主要发现,包括主要的形态学检查表现、相关的关键性或主要的量化资料以及相应的统计学比较结果,须写明统计学量值及其概率值。结论部分请提出与本研究论据直接相关的、必然的推论,避免得出过度推测性、评价性和扩大化的结论。摘要请用第三人称客观表述,不列图表,不引用文献,不加评论和解释。英文摘要应与中文摘要内容相对应,但为了对外交流的需要,可以略详细。英文摘要应包括论文题名(正体)及全部作者姓名(汉语拼音,姓在前,首字母大写,名在后,首字母大写,双字连写。如:Yin Xiaohui)、标准化的单位名称、城市名称(汉语拼音)、邮政编码及国家名称(全部为斜体)。并请在另起一行处提供通信作者姓名的汉语拼音和 Email 地址,如 *Corresponding author: Yin Xiaohui, Email: xiaohui@126.com*。专家述评或综述类文稿请撰写指示性中英文摘要,摘要内容应包含研究涉及的概念、研究的目的、综述资料的来源、复习的文献量、研究的新发现或应用领域、综合的结果和结论及其意义等必要的信息。

研究论文为前瞻性研究者应在中英文摘要结束处提供临床试验注册号,以“临床试验注册(Trial registration)”为标题,提供注册机构名称和注册号。前瞻性临床研究的论著摘要应注明遵循 CONSORT 声明(Consolidated Standards of Reporting Trials)(<http://www.consort-standart.org/home>)。

## 本刊投稿方式

初次投稿作者请按照下列步骤投稿:登录中华医学会网站(<http://www.cma.org.cn>)→点击页面右上角的“注册”→选项注册账号→返回首页→点击页面右下方的“申请成为杂志作者”成为本刊作者进行投稿。投稿时请使用 Word 格式(.doc 文件类型),投稿后请注意自留原稿,并保留论文相关的原始资料,以备稿件修改补充所用。投稿后请从“业务中心”下载“中华医学会系列杂志论文投送介绍信及授权书(中文版)”,填写有关项目并请每位作者亲笔签字,加盖单位公章后寄 2 份至本刊编辑部,其中作者签名顺序和作者单位著录名称应与投稿时文章中著录的相一致,如有变更应由每位作者同意并请通信作者告知编辑部。投稿请注意:(1)在非公开刊物发表的稿件、学术会议交流的文章、已用非中文文字期刊发表的文稿不属于一稿两投,但投稿时应向编辑部说明,非中文文字期刊已发表的文稿须经得首次发表期刊的同意。(2)作者须告知与该研究有关的利益冲突,如该研究被某机构资金资助的声明或与审稿人的利益关系。(3)如涉及保密问题,需附有关部门审查同意发表的证明。

(本刊编辑部)