

基于类器官的视网膜色素变性疾病模型构建及研究进展

谢林瑶¹ 综述 陈建苏¹ 郭永龙² 审校

¹暨南大学基础医学与公共卫生学院, 广州 510632; ²华南农业大学兽医学院, 广州 510642

通信作者: 郭永龙, Email: winglung@scau.edu.cn

【摘要】 基于多能干细胞定向诱导分化视网膜类器官(RO)技术可以高度模拟人类视网膜的发育过程, 帮助深入理解视网膜的发育机制, 并为视网膜疾病提供新的治疗方法。目前, RO 广泛应用于视网膜疾病的机制和治疗研究, 尤其在视网膜色素变性(RP)中取得了较为突出的进展。本文总结了利用人多能干细胞制备 RO 的方法, 阐述了 RO-RP 疾病模型在 *PRPF31*、*RPGR*、*CRB1*、*RP2*、*IMPG2*、*NR2E3*、*USH2A*、*PDE6B* 和 *TRNT1* 等不同突变基因中的机制与治疗应用, 概括其在药物筛选、药物毒性试验、基因疗法和细胞疗法方面的研究进展, 讨论了 RO 的研究及应用挑战。

【关键词】 视网膜类器官; 视网膜色素变性; 疾病模型

基金项目: 国家自然科学基金(32370878、32061160469)

DOI: 10.3760/cma.j.cn115989-20230808-00061

Construction and research progress of organoid models for retinitis pigmentosa

Xie Linyao¹, Chen Jiansu¹, Guo Yonglong²

¹School of Basic Medicine and Public Health, Jinan University, Guangzhou 510632, China; ²College of Veterinary Medicine, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China

Corresponding author: Guo Yonglong, Email: winglung@scau.edu.cn

[Abstract] After more than ten years of development, retinal organoid (RO) based on pluripotent stem cells can highly simulate the development process of human retina, provide insight into the mechanism of retinal development and provide new treatments for retinal diseases. At present, RO has been widely used in the research of the mechanism and treatment of retinal diseases, especially in retinitis pigmentosa (RP). This review summarizes the methods of preparing RO from human pluripotent stem cells, and elaborates the mechanism and therapeutic application of RO-RP disease model in different mutated genes such as *PRPF31*, *RPGR*, *CRB1*, *RP2*, *IMPG2*, *NR2E3*, *USH2A*, *PDE6B* and *TRNT1*, as well as the research progress of RO in drug screening, drug toxicity testing, gene therapy and cell therapy, and discusses the research and application challenges of RO.

[Key words] Retinal organoids; Retinitis pigmentosa; Disease model

Fund program: National Natural Science Foundation of China (32370878, 32061160469)

DOI: 10.3760/cma.j.cn115989-20230808-00061

视网膜位于眼球壁内层, 由色素上皮层和神经层组成。神经层主要包含视杆细胞和视锥细胞 2 种感光细胞以及双极细胞、神经节细胞、水平细胞和无长突细胞 4 种神经元。进化级别较低的脊椎动物, 如两栖动物和斑马鱼等, 具有强大的视网膜再生能力, 而哺乳动物的视网膜几乎无法再生^[1]。人类视网膜一旦受损或发生病变, 难以自我修复或者再生。目前, 视网膜疾病, 如年龄相关性黄斑变性、视网膜色素变性 (retinitis pigmentosa, RP)、视网膜母细胞瘤等, 是导致视力受损和盲的重要原因。由于缺乏相应的模型, 视网膜疾病的治疗是现代医学面临的重大难题。

类器官是一类由干细胞和肿瘤组织细胞等, 在体外进行培养, 形成与来源器官组织基因、结构和功能相似的细胞培养

物^[2]。由多能干细胞 (induced pluripotent stem cells, iPSCs) 定向分化来源的视网膜类器官 (retinal organoid, RO) 具备无限来源的优势且几乎没有伦理问题, 可以为视网膜发育机制研究和疾病研究提供良好的体外模型^[3]。RO 几乎包含所有主要的视网膜特异性细胞类型, 能够表现视网膜的主要形态和功能^[4]。本文总结了 RO 的分化方案, 以及其作为 RP 疾病模型的研究及应用进展。

1 基于人 iPSCs 的 RO 模型分化方案

目前, 模拟机体视网膜发育过程的 RO 定向分化主要有 3 个阶段: 分化早期 (≤ 30 d)、中期 (30~120 d) 和晚期 (≥ 120 d)。其中分化早期以神经外胚层、内神经节层和部分内丛状层的分

化为主,包括 PAX6 阳性的视网膜神经祖细胞,SNCG 阳性的神经节细胞和少量 CHAT 阳性的无长突细胞;中期表现为光感起受器和双极细胞的分化,主要包括 CaR 阳性的无长突细胞和视网膜神经节细胞、OCT1 阳性的水平祖细胞、OTX2 阳性的光感受器祖细胞以及 CRX 阳性和 RCVRN 阳性的感光细胞;晚期是外丛状层和外核层的成熟以及外界膜的形成,包括 M/L-opsin 阳性、CRX 阳性和 ARR3 阳性的视锥细胞, NR2E3 阳性和 NRL 阳性的视杆细胞,以及 CRALBP 阳性的 Müller 胶质细胞^[5]。

RO 的分化方案主要有 3D 悬浮和 2D 贴壁法,两者的主要区别在于拟胚体 (embryoid body, EB) 阶段。3D 方案从 EB 阶段开始,到视囊泡、视杯以及最终成熟的感光细胞均悬浮培养。2011 年, Eiraku 等利用解离的胚胎干细胞自发形成半球形的视囊泡,然后在 9~10 d 内逐渐分化出视杯,最终在长期的培养中获得完整的视网膜组织^[6-7]。2012 年,该课题组利用类似的方法,成功地从人类胚胎干细胞分化出视杯^[8]。而 2D 方案则不经过 EB 阶段,诱导 iPSCs 直接贴壁分化为视网膜神经祖细胞,产生视囊泡,随后在第 17~25 d 分化出视杯结构;然后机械分离这些神经视网膜结构,进行悬浮培养,最终可以分化出所有主要的视网膜细胞类型。Zhong 等^[9]也利用此法成功模拟了视网膜发育的主要步骤,形成了完全层叠的 3D 视网膜组织。

然而,体外方案诱导 RO 与在体视网膜组织仍有一定的差别,如与视网膜色素上皮细胞的相互作用以及血管系统的营养供应等。器官芯片技术可以在 RO 中起到模拟血-视网膜屏障的作用,生成复杂的多层组织模型^[10]。Yeste 等^[11]提出了一种新型微流控装置——细胞通过微槽网格高度连通排列在平行的隔室中,有助于多个组织之间的信号传导,以及 RO 与其他类型细胞的相互接触。

2 RO-RP 疾病模型的建立

研究人员利用 RO 研究视网膜疾病的病理过程 and 治疗方法,例如 RP、视网膜母细胞瘤、青光眼和 Leber 先天性黑朦^[12]。RP 是一种遗传性视网膜变性疾病,患病率为 1/4 000^[13]。RP 是由一系列的基因突变或缺失导致的视网膜光感受器细胞逐渐退化,临床表现通常包括早期夜盲,伴有进行性视野缺损、眼底色素沉着和视网膜电图异常等。目前已知超过 70 个基因可引起非综合征性 RP^[14]。RP 表现出复杂的遗传特性,包括常染

色体显性遗传 (15%~25%)、常染色体隐性遗传 (35%~50%) 和 X 连锁遗传 (7%~15%)^[15]。基因检测方法,如 Sanger 测序、高通量测序和单分子测序,可以对 RP 的突变基因及其位点进行精准诊断。与其他动物模型相比,患者 iPSCs 来源的 RO 模型更能概括 RP 的特征,是研究发病机制和药物开发的理想方法^[16]。下面主要介绍以 RO 为模型,研究不同基因突变引发 RP 的研究 (表 1)。

表 1 不同基因引发的 RO-RP 模型特点

遗传方式	基因	RO 特点	分化方案
常染色体显性遗传	<i>PRPF31</i>	视网膜色素上皮细胞具有结构异常和功能缺陷;视杆和视锥细胞持续凋亡,纤毛有数量和长度缺陷,存在应激液泡	3D 悬浮 ^[19] 、2D 贴壁 ^[20]
	<i>NR2E3</i>	分化早期含有活跃增殖的极化神经上皮细胞,且在分化 15~16 周后即显示出 SW 视蛋白的强阳性标记	3D 悬浮 ^[36]
	<i>RHO</i>	视网膜细胞中视杆细胞显示出典型的内质网应激特征	2D 贴壁 ^[60]
X 连锁遗传	<i>RPGR</i>	纤毛变短;光感受器在形态、定位、转录谱和电生理方面存在显著缺陷	3D 悬浮 ^[22-23]
	<i>RP2</i>	分化第 150 天视杆细胞凋亡,第 180 天类器官外核层变薄	2D 贴壁 ^[29]
	常染色体隐性遗传	<i>CRB1</i>	外界膜上的感光细胞错位,视网膜外界膜受损
<i>IMP2</i>		光感受器外段缺乏,光感受器间基质的稳定性受到破坏	2D 贴壁 ^[31]
<i>USH2A</i>		细胞凋亡增加,视网膜色素上皮发育不良和表型表达异常,基底膜变性;视网膜神经上皮和光感受器发育缺陷	2D 贴壁 ^[38-39]
<i>PDE6B</i>		有明显的视杆细胞迁移能力缺陷;G 蛋白偶联受体信号传导通路和钙离子结合相关基因富集;cGMP 水平增加;感光细胞纤毛减少	3D 悬浮 ^[41]
	<i>TRNT1</i>	自噬缺陷,扰乱蛋白质平衡影响感光细胞活力	3D 悬浮 ^[43]

注:RO:视网膜类器官;RP:视网膜色素变性

(1) PRPF31 (前 mRNA 加工因子 31) PRPF31 突变是引起常染色体显性 RP 的主要因素之一,其在常染色体显性 RP 中的患病率为 1%~8%^[17-18]。Buskin 等^[19]将 4 例 PRPF31 的 RP 患者的 iPSCs 定向分化为 RO,发现该 RO 具有退行性病变特征,包括感光细胞凋亡增加和存在应激液泡;此外,RP 患者 RO 的感光细胞纤毛数量减少且长度缩短。Rodrigues 等^[20]发现 2 例 PRPF31 低水平表达 RP 患者来源的视网膜色素上皮细胞具有结构异常和功能缺陷,在同样来源的 RO 中表现为视杆和视锥细胞持续凋亡。(2) RPGR (视网膜色素变性 GTP 酶调节剂) RPGR 是遗传性 RP 最普遍的致病基因之一,超过 70% 的 X 连锁 RP 患者携带 RPGR 突变^[21]。Deng 等^[22]发现 3 例患者的视网膜色素上皮细胞和 RO 感光细胞存在纤毛变短的异常特征,光感受器在形态、定位、转录谱和电生理活性方面存在显著缺陷。随后, Li 等^[23]也成功地利用 RP 患者来源的 iPSCs 建立了 3D RO,同样发现其纤毛缩短及光感受器缺陷。(3) CRB1 (Crumbs 同系物 1) 由 *CRB1* 基因突变引起的 RP 占常染色体隐性 RP 的 2.7%^[24]。Quinn 等^[25]发现 3 例 CRB1 突变 RP 患者来源的 iPSCs 分化为 RO 时,外界膜上的细胞分布发

生错位,证明视网膜外界膜受损。Moon 等^[26]用患者真皮成纤维细胞构建 2 株携带 CRB1 复合杂合突变的 iPSCs,这 2 株细胞均显示正常核型,有分化为三胚层和 RO 的能力。此外,Boon 等^[27]利用单细胞 RNA 测序技术,揭示了 CRB1 患者来源的 RO 视杆细胞中存在异常的内体途径以及细胞黏附和受体结合相关的差异。(4)RP2(视网膜色素变性 2 同源物) RP2 基因突变约占所有 X 连锁 RP 病例的 15%^[28]。Lane 等^[29]发现,RP2 基因敲除和 RP2 患者来源的 RO 在第 150 d 出现视杆细胞凋亡,在第 180 d 外核层变薄。(5)IMPG2(光感受器间基质蛋白聚糖 2) IMPG2 突变可引起严重的早发性 RP 伴黄斑受累,属于常染色体隐性 RP^[30]。Mayerl 等^[31]通过患者来源及基因编辑的 RO 发现,由于 IMPG2 无法表达或其转录后修饰功能异常,导致其缺乏光感受器外段,进而破坏光感受器间基质的稳定性。(6)NR2E3(核受体亚家族 2 组 E 成员 3) NR2E3 是一种光感受器特异性转录因子,也是视杆细胞发育和维持的关键因素^[32-33]。NR2E3 的 DNA 结合域中有一种被称为 G56R 的特定变异,G56R 等位基因突变导致常染色体显性 RP,在美国占常染色体显性遗传 RP 病例总数的 1%~2%,在欧洲占 3.5%^[34-35]。Wiley 等^[36]研究发现,NR2E3 基因突变患者 RO 的分化早期含有活跃增殖的极化神经上皮细胞,且在分化 15~16 周后即显示出 SW 视蛋白的强阳性标记。(7)USH2A(尤塞综合征 II A 型) USH2A 基因突变是常染色体隐性非综合征性 RP 的主要原因,占病例的 12%~25%^[37]。Guo 等^[38]发现 USH2A 基因突变 RP 患者来源 RO 发育异常,表现为细胞凋亡增加,视网膜色素上皮细胞发育不良、基底膜变性,以及视网膜神经上皮和光感受器发育缺陷。Su 等^[39]证明 RP 患者来源 RO 和视网膜色素上皮细胞的凋亡增加与细胞外基质组蛋白缺乏相关。(8)PDE6B(磷酸二酯酶 6B) PDE6B 突变可以导致常染色体隐性 RP,占常染色体隐性 RP 的 4%~6%^[40]。Gao 等^[41]利用携带 PDE6B 突变的迟发性 RP 患者的 iPSCs 分化成 RO,发现与对照组相比,在分化第 180 天之前,患者 RO 表现相对正常;然而,分化 230 天之后,患者 RO 出现明显的视杆细胞迁移能力缺陷;此外,通过转录组学结果发现,患者 RO 中 G 蛋白偶联受体活性相关基因、G 蛋白偶联受体信号传导通路和钙离子结合相关基因富集;另外,患者 RO 中 cGMP 水平增加,可能导致突触连接的形成受损,并且患者 RO 中感光细胞纤毛减少。(9)TRNT1(TRNA 核苷酸转移酶 1) TRNT1 基因中的亚态性突变可以引起 RP 伴铁粒幼细胞贫血^[42]。Sharma 等^[43]构建了 TRNT1 基因突变 RP 患者 iPSCs 来源的 RO,发现患者特异性 iPSCs 中 TRNT1 总量升高,LC3-II 异常积累导致氧化应激水平升高,同时患者 iPSCs 及其来源的 RO 表现出自噬缺陷,扰乱蛋白质平衡并影响感光细胞活力。

3 基于 RO-RP 疾病模型的应用研究

3.1 药物筛选

逐渐成熟的 RO-RP 疾病模型可用于药物筛选和药物评估^[44]。研究者发现,应用 RO 模型,采用翻译通读诱导类药物 PTC124,能够恢复 RP2 突变中 Kif7 和 Gli3 的纤毛定位,对治疗

RP 具有临床意义^[45]。Ito 等^[46]利用化学诱导的光感受器变性 RO 评估 α -生育酚(维生素 E)等在感光细胞中的作用,结果显示较高剂量的维生素 E 具有更好的保护作用,相比之下,叶黄素、虾青素和花青素分别在 0.4 $\mu\text{mol/L}$ 、0.2 $\mu\text{mol/L}$ 和 20 $\mu\text{mol/L}$ 下显示出最大的保护作用。这表明 RO 在药物的检测和筛选上具有一定意义。

3.2 药物毒性试验

RO 也可用于药物毒性试验。Hallam 等^[47]探究了不同浓度莫西沙星对 RO 的影响,以确定其对视网膜毒性的机制,发现 $\geq 300 \mu\text{g/ml}$ 的莫西沙星对基因表达的影响最大,主要的靶细胞是 RO 光感受器和无长突细胞。另有研究还测试了酮咯酸、地高辛、硫利达嗪、西地那非、乙醇和甲醇对 RO 的毒性,为 RO 在毒理学研究中的应用提供了强有力的实验证据^[48]。

3.3 基因疗法

基因疗法可以逆转 RP 患者来源 RO 的病理变化,为未来治疗策略提供了方向^[49]。PRPF31 基因突变 RP 可以通过腺相关病毒介导的基因增强来治疗^[20]。RPGR 突变可以通过 CRISPR-Cas9 基因编辑校正 RPGR 基因^[22-23]。此外,West 等^[50]在 RPGR-RP 模型中利用抗氧化剂和 BSA 结合脂肪酸的使用,促进杆状和视锥光感受器的外段形成,并在腺相关病毒介导的基因增强后得到改善。RP2 基因病变可以通过腺相关病毒介导的 RP2 基因编辑来治疗^[29]。Diakatou 等^[51]首次证明 G56R 突变患者来源的 iPSCs 及 G56R 基因敲除的 iPSCs 可以分化出正常表达 NR2E3 的 RO,且主要的感光细胞发育正常,G56R 等位基因的特异性敲除可能是 NR2E3 相关常染色体显性 RP 的治疗方法。CRB1 突变患者来源的 RO 在腺相关病毒介导的基因增强疗法下或 CRISPR/Cas2480 介导的同源定向修复可恢复视网膜的组织学和转录表型^[27,52]。

3.4 细胞疗法

视网膜细胞移植是治疗 RP 的重要研究方向。RO 能够产生大量的光感受器,这些光感受器可以进一步用于视网膜疾病的细胞疗法^[53]。Gonzalez-Cordero 等^[54]成功将从 RO 分离出的视锥细胞移植到成年小鼠视网膜内,表明光感受器移植具有治疗视网膜变性的潜力。移植细胞能与宿主双极细胞形成突触并产生光反应,这些细胞在大鼠中至少存活了 5 个月,在猴子中存活时间超过 2 年,证明了这种治疗方法的长期潜力^[55]。此外,从培养的组织器官中分离出的 RO 细胞片也可以移植到视网膜的病变层中,并在动物模型中证实可以改善视网膜的光反应性^[56]。这种方案保留了视网膜的原始结构,克服了悬浮单散细胞移植的缺点。

4 总结及展望

RO 技术具有巨大的潜力,在视网膜发育及相关疾病研究领域发挥重要作用。然而,RO 技术仍存在一些不可忽视的问题。首先,由 iPSCs 分化成 RO 需要昂贵的成本和漫长的时间。未来可通过提高类器官的生产效率和可重复性来改善。Cowan 等^[57]通过微孔阵列培养,成功在 6 孔板的单孔 iPSCs 生成 3 000 多个 RO。其次,目前的 RO 缺乏与非眼组织的复杂组

织,导致与邻近组织的相互作用。共培养体系有望改善类器官的发育和成熟问题,例如类器官的血管化^[58]。另外,诱导方案的差别以及不同批次 RO 大小、发育阶段和不同细胞的比例等差异,也是 RO 研究的一大难题。近期, Capowski 等^[5]开发了 RO 的分期诱导系统,可以降低 RO 培养中的异质性,有效提高 RO 在发育研究、疾病建模和移植的可重复性。此外, Perepelkina 等^[59]发现,在利用小鼠 ESC 诱导分化 RO 时,设置初始细胞数量为 10 000 个/球时,产生的细胞球直径为 380 ~ 550 μm ,可以显著降低不同批次之间 RO 的异质程度。

RO 技术在探究 RP 等疾病的致病机制和干预治疗等方面发挥了重要作用。建立的 RO-RP 疾病模型可用于药物筛选、药物毒性试验、基因治疗和细胞治疗等。随着 RO 技术的逐渐完善,未来 RO 有望实现对不可逆视网膜疾病的诊断和治疗,为视网膜变性患者带来光明未来。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Karl MO, Reh TA. Regenerative medicine for retinal diseases: activating endogenous repair mechanisms [J]. *Trends Mol Med*, 2010, 16 (4) : 193-202. DOI: 10. 1016/j. molmed. 2010. 02. 003.
- [2] Rossi G, Manfrin A, Lutolf MP. Progress and potential in organoid research [J]. *Nat Rev Genet*, 2018, 19 (11) : 671-687. DOI: 10. 1038/s41576-018-0051-9.
- [3] Zhang X, Wang W, Jin ZB. Retinal organoids as models for development and diseases [J/OL]. *Cell Regen*, 2021, 10 (1) : 33 [2023-08-02]. [http://www. ncbi. nlm. nih. gov/pubmed/34719743](http://www. ncbi..nlm.nih.gov/pubmed/34719743). DOI: 10. 1186/s13619-021-00097-1.
- [4] Afanasyeva T, Corral-Serrano JC, Garanto A, et al. A look into retinal organoids: methods, analytical techniques, and applications [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2021, 78 (19-20) : 6505-6532. DOI: 10. 1007/s00018-021-03917-4.
- [5] Capowski EE, Samimi K, Mayerl SJ, et al. Reproducibility and staging of 3D human retinal organoids across multiple pluripotent stem cell lines [J/OL]. *Development*, 2019, 146 (1) : dev171686 [2023-08-02]. <http://www. ncbi. nlm. nih. gov/pubmed/30567931>. DOI: 10. 1242/dev. 171686.
- [6] Eiraku M, Sasai Y. Mouse embryonic stem cell culture for generation of three-dimensional retinal and cortical tissues [J]. *Nat Protoc*, 2011, 7 (1) : 69-79. DOI: 10. 1038/nprot. 2011. 429.
- [7] 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.
- [8] 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.
- [9] 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 [2023-08-02]. <http://www. ncbi. nlm. nih. gov/pubmed/24915161>. DOI: 10. 1038/ncomms5047.
- [10] Achberger K, Probst C, Haderspeck J, et al. Merging organoid and organ-on-a-chip technology to generate complex multi-layer tissue models in a human retina-on-a-chip platform [J/OL]. *Elife*, 2019, 8 : e46188 [2023-08-02]. <http://www. ncbi. nlm. nih. gov/pubmed/31451149>. DOI: 10. 7554/eLife. 46188.
- [11] Yeste J, Garcia-Ramirez M, Illa X, et al. A compartmentalized microfluidic chip with crisscross microgrooves and electrophysiological electrodes for modeling the blood-retinal barrier [J]. *Lab Chip*, 2017, 18 (1) : 95-105. DOI: 10. 1039/c7lc00795g.
- [12] Zhang Z, Xu Z, Yuan F, et al. Retinal organoid technology: where are we now? [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22 (19) : 10244 [2023-08-02]. <http://www. ncbi. nlm. nih. gov/pubmed/34638582>. DOI: 10. 3390/ijms221910244.
- [13] Pagon RA. Retinitis pigmentosa [J]. *Surv Ophthalmol*, 1988, 33 (3) : 137-177. DOI: 10. 1016/0039-6257(88)90085-9.
- [14] Tsang SH, Sharma T. Autosomal dominant retinitis pigmentosa [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2018, 1085 : 69-77. DOI: 10. 1007/978-3-319-95046-4_15.
- [15] Ayuso C, Millan JM. Retinitis pigmentosa and allied conditions today: a paradigm of translational research [J/OL]. *Genome Med*, 2010, 2 (5) : 34 [2023-08-02]. <http://www. ncbi. nlm. nih. gov/pubmed/20519033>. DOI: 10. 1186/gm155.
- [16] Ma C, Jin K, Jin ZB. Generation of human patient iPSC-derived retinal organoids to model retinitis pigmentosa [J/OL]. *J Vis Exp*, 2022 : 184 [2023-08-02]. <http://www. ncbi. nlm. nih. gov/pubmed/35786611>. DOI: 10. 3791/64045.
- [17] Audo I, Bujakowska K, Mohand-Saïd S, et al. Prevalence and novelty of PRPF31 mutations in French autosomal dominant rod-cone dystrophy patients and a review of published reports [J/OL]. *BMC Med Genet*, 2010, 11 : 145 [2023-08-02]. <http://www. ncbi. nlm. nih. gov/pubmed/20939871>. DOI: 10. 1186/1471-2350-11-145.
- [18] Martin-Merida I, Sanchez-Alcudia R, Fernandez-San Jose P, et al. Analysis of the PRPF31 gene in Spanish autosomal dominant retinitis pigmentosa patients: a novel genomic rearrangement [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2017, 58 (2) : 1045-1053. DOI: 10. 1167/iovs. 16-20515.
- [19] Buskin A, Zhu L, Chichagova V, et al. Disrupted alternative splicing for genes implicated in splicing and ciliogenesis causes PRPF31 retinitis pigmentosa [J/OL]. *Nat Commun*, 2018, 9 (1) : 4234 [2023-08-02]. <http://www. ncbi. nlm. nih. gov/pubmed/30315276>. DOI: 10. 1038/s41467-018-06448-y.
- [20] Rodrigues A, Slembrouck-Brec A, Nanteau C, et al. Modeling PRPF31 retinitis pigmentosa using retinal pigment epithelium and organoids combined with gene augmentation rescue [J/OL]. *NPJ Regen Med*, 2022, 7 (1) : 39. <http://www. ncbi. nlm. nih. gov/pubmed/35974011>. DOI: 10. 1038/s41536-022-00235-6.
- [21] Birtel J, Gliem M, Mangold E, et al. Next-generation sequencing identifies unexpected genotype-phenotype correlations in patients with retinitis pigmentosa [J/OL]. *PLoS One*, 2018, 13 (12) : e0207958 [2023-08-02]. <http://www. ncbi. nlm. nih. gov/pubmed/30543658>. DOI: 10. 1371/journal. pone. 0207958.
- [22] 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.
- [23] Li YP, Deng WL, Jin ZB. Modeling retinitis pigmentosa through patient-derived retinal organoids [J/OL]. *STAR Protoc*, 2021, 2 (2) : 100438 [2023-08-02]. <http://www. ncbi. nlm. nih. gov/pubmed/33899019>. DOI: 10. 1016/j. xpro. 2021. 100438.
- [24] Bujakowska K, Audo I, Mohand-Saïd S, et al. CRB1 mutations in inherited retinal dystrophies [J]. *Hum Mutat*, 2012, 33 (2) : 306-315. DOI: 10. 1002/humu. 21653.
- [25] Quinn PM, Buck TM, Mulder AA, et al. Human iPSC-derived retinas recapitulate the fetal CRB1 CRB2 complex formation and demonstrate that photoreceptors and Müller glia are targets of AAV5 [J]. *Stem Cell Reports*, 2019, 12 (5) : 906-919. DOI: 10. 1016/j. stemcr. 2019. 03. 002.
- [26] Moon SY, Zhang D, Chen SC, et al. Generation of two induced pluripotent stem cell lines from a retinitis pigmentosa patient with compound heterozygous mutations in CRB1 [J/OL]. *Stem Cell Res*, 2021, 54 : 102403 [2023-08-02]. <http://www. ncbi. nlm. nih. gov/pubmed/34034222>. DOI: 10. 1016/j. scr. 2021. 102403.
- [27] Boon N, Lu X, Andriessen CA, et al. AAV-mediated gene augmentation therapy of CRB1 patient-derived retinal organoids restores the histological and transcriptional retinal phenotype [J]. *Stem Cell Reports*, 2023, 18 (5) : 1123-1137. DOI: 10. 1016/j. stemcr. 2023. 03. 014.
- [28] Breuer DK, Yashar BM, Filippova E, et al. A comprehensive mutation analysis of RP2 and RPGR in a North American cohort of families with X-linked retinitis pigmentosa [J]. *Am J Hum Genet*, 2002, 70 (6) : 1545-1554. DOI: 10. 1086/340848.

- [29] Lane A, Jovanovic K, Shortall C, et al. Modeling and rescue of RP2 retinitis pigmentosa using iPSC-derived retinal organoids [J]. *Stem Cell Reports*, 2020, 15(1) : 67–79. DOI: 10.1016/j.stemcr.2020.05.007.
- [30] Bandah-Rozenfeld D, Collin RW, Banin E, et al. Mutations in IMPG2, encoding interphotoreceptor matrix proteoglycan 2, cause autosomal-recessive retinitis pigmentosa [J]. *Am J Hum Genet*, 2010, 87(2) : 199–208. DOI: 10.1016/j.ajhg.2010.07.004.
- [31] Mayerl SJ, Bajgai S, Ludwig AL, et al. Human retinal organoids harboring IMPG2 mutations exhibit a photoreceptor outer segment phenotype that models advanced retinitis pigmentosa [J]. *Stem Cell Reports*, 2022, 17(11) : 2409–2420. DOI: 10.1016/j.stemcr.2022.09.004.
- [32] Milam AH, Rose L, Cideciyan AV, et al. The nuclear receptor NR2E3 plays a role in human retinal photoreceptor differentiation and degeneration [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002, 99(1) : 473–478. DOI: 10.1073/pnas.022533099.
- [33] Chen J, Rattner A, Nathans J. The rod photoreceptor-specific nuclear receptor Nr2e3 represses transcription of multiple cone-specific genes [J]. *J Neurosci*, 2005, 25(1) : 118–129. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.3571-04.2005.
- [34] Gire AI, Sullivan LS, Bowne SJ, et al. The Gly56Arg mutation in NR2E3 accounts for 1–2% of autosomal dominant retinitis pigmentosa [J]. *Mol Vis*, 2007, 13 : 1970–1975.
- [35] Blanco-Kelly F, García Hoyos M, Lopez Martinez MA, et al. Dominant retinitis pigmentosa, p. Gly56Arg mutation in NR2E3; phenotype in a large cohort of 24 cases [J/OL]. *PLoS One*, 2016, 11(2) : e0149473 [2023-08-06]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26910043>. DOI: 10.1371/journal.pone.0149473.
- [36] Wiley LA, Burnight ER, DeLuca AP, et al. cGMP production of patient-specific iPSCs and photoreceptor precursor cells to treat retinal degenerative blindness [J/OL]. *Sci Rep*, 2016, 6 : 30742 [2023-08-02]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27471043>. DOI: 10.1038/srep30742.
- [37] Toualbi L, Toms M, Moosajee M. USH2A-retinopathy; from genetics to therapeutics [J/OL]. *Exp Eye Res*, 2020, 201 : 108330 [2023-08-06]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33121974>. DOI: 10.1016/j.exer.2020.108330.
- [38] Guo Y, Wang P, Ma JH, et al. Modeling retinitis pigmentosa: retinal organoids generated from the iPSCs of a patient with the USH2A mutation show early developmental abnormalities [J/OL]. *Front Cell Neurosci*, 2019, 13 : 361 [2023-08-02]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31481876>. DOI: 10.3389/fncel.2019.00361.
- [39] Su T, Liang L, Zhang L, et al. Retinal organoids and microfluidic chip-based approaches to explore the retinitis pigmentosa with USH2A mutations [J/OL]. *Front Bioeng Biotechnol*, 2022, 10 : 939774 [2023-08-02]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/36185441>. DOI: 10.3389/fbioe.2022.939774.
- [40] Danciger M, Blaney J, Gao YQ, et al. Mutations in the PDE6B gene in autosomal recessive retinitis pigmentosa [J]. *Genomics*, 1995, 30(1) : 1–7. DOI: 10.1006/geno.1995.0001.
- [41] Gao ML, Lei XL, Han F, et al. Patient-specific retinal organoids recapitulate disease features of late-onset retinitis pigmentosa [J/OL]. *Front Cell Dev Biol*, 2020, 8 : 128 [2023-08-02]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32211407>. DOI: 10.3389/fcell.2020.00128.
- [42] DeLuca AP, Whitmore SS, Barnes J, et al. Hypomorphic mutations in TRNT1 cause retinitis pigmentosa with erythrocytic microcytosis [J]. *Hum Mol Genet*, 2016, 25(1) : 44–56. DOI: 10.1093/hmg/ddv446.
- [43] Sharma TP, Wiley LA, Whitmore SS, et al. Patient-specific induced pluripotent stem cells to evaluate the pathophysiology of TRNT1-associated retinitis pigmentosa [J]. *Stem Cell Res*, 2017, 21 : 58–70. DOI: 10.1016/j.scr.2017.03.005.
- [44] Aasen DM, Vergara MN. New drug discovery paradigms for retinal diseases: a focus on retinal organoids [J]. *J Ocul Pharmacol Ther*, 2020, 36(1) : 18–24. DOI: 10.1089/jop.2018.0140.
- [45] Schwarz N, Lane A, Jovanovic K, et al. Arl3 and RP2 regulate the trafficking of ciliary tip kinesins [J]. *Hum Mol Genet*, 2017, 26(13) : 2480–2492. DOI: 10.1093/hmg/ddx143.
- [46] Ito SI, Onishi A, Takahashi M. Chemically-induced photoreceptor degeneration and protection in mouse iPSC-derived three-dimensional retinal organoids [J]. *Stem Cell Res*, 2017, 24 : 94–101. DOI: 10.1016/j.scr.2017.08.018.
- [47] Hallam D, Hilgen G, Dorgau B, et al. Human-induced pluripotent stem cells generate light responsive retinal organoids with variable and nutrient-dependent efficiency [J]. *Stem Cells*, 2018, 36(10) : 1535–1551. DOI: 10.1002/stem.2883.
- [48] Dorgau B, Georgiou M, Chaudhary A, et al. Human retinal organoids provide a suitable tool for toxicological investigations; a comprehensive validation using drugs and compounds affecting the retina [J]. *Stem Cells Transl Med*, 2022, 11(2) : 159–177. DOI: 10.1093/stctm/ztzab010.
- [49] Arthur P, Muok L, Nathani A, et al. Bioengineering human pluripotent stem cell-derived retinal organoids and optic vesicle-containing brain organoids for ocular diseases [J/OL]. *Cells*, 2022, 11(21) : 3429 [2023-08-06]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/36359825>. DOI: 10.3390/cells11213429.
- [50] West EL, Majumder P, Naeem A, et al. Antioxidant and lipid supplementation improve the development of photoreceptor outer segments in pluripotent stem cell-derived retinal organoids [J]. *Stem Cell Reports*, 2022, 17(4) : 775–788. DOI: 10.1016/j.stemcr.2022.02.019.
- [51] Diakatou M, Dubois G, Erkilic N, et al. Allele-specific knockout by CRISPR/Cas to treat autosomal dominant retinitis pigmentosa caused by the G56R mutation in NR2E3 [J/OL]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(5) : 2607 [2023-08-06]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33807610>. DOI: 10.3390/ijms22052607.
- [52] da Costa BL, Li Y, Levi SR, et al. Generation of CRB1 RP patient-derived iPSCs and a CRISPR/Cas9-mediated homology-directed repair strategy for the crb1 c. 2480g>t mutation [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2023, 1415 : 571–576. DOI: 10.1007/978-3-031-27681-1_83.
- [53] Llonch S, Carido M, Ader M. Organoid technology for retinal repair [J]. *Dev Biol*, 2018, 433(2) : 132–143. DOI: 10.1016/j.ydbio.2017.09.028.
- [54] 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.
- [55] Tu HY, Watanabe T, Shirai H, et al. Medium- to long-term survival and functional examination of human iPSC-derived retinas in rat and primate models of retinal degeneration [J]. *EBioMedicine*, 2019, 39 : 562–574. DOI: 10.1016/j.ebiom.2018.11.028.
- [56] Akiba R, Takahashi M, Baba T, et al. Progress of iPSC cell-based transplantation therapy for retinal diseases [J]. *Jpn J Ophthalmol*, 2023, 67(2) : 119–128. DOI: 10.1007/s10384-022-00974-5.
- [57] Cowan CS, Renner M, De Gennaro M, et al. Cell types of the human retina and its organoids at single-cell resolution [J]. *Cell*, 2020, 182(6) : 1623–1640. DOI: 10.1016/j.cell.2020.08.013.
- [58] Wörsdörfer P, Dalda N, Kern A, et al. Generation of complex human organoid models including vascular networks by incorporation of mesodermal progenitor cells [J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1) : 15663 [2023-08-06]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31666641>. DOI: 10.1038/s41598-019-52204-7.
- [59] Perepelkina T, Kegeles E, Baranov P. Optimizing the conditions and use of synthetic matrix for three-dimensional *in vitro* retinal differentiation from mouse pluripotent cells [J]. *Tissue Eng Part C Methods*, 2019, 25(7) : 433–445. DOI: 10.1089/ten.TEC.2019.0053.
- [60] Jin ZB, Okamoto S, Xiang P, et al. Integration-free induced pluripotent stem cells derived from retinitis pigmentosa patient for disease modeling [J]. *Stem Cells Transl Med*, 2012, 1(6) : 503–509. DOI: 10.5966/sctm.2012-0005.

(收稿日期:2023-10-09 修回日期:2024-04-10)

(本文编辑:张宇 骆世平)