・实验研究・

# 试剂盒分化法与烟酰胺分化法对人诱导多能 干细胞向 RPE 细胞分化效果的比较

唐沁雪1 张帆2 李娟2 刘勇1

<sup>1</sup>陆军军医大学第一附属医院眼科,重庆 400038;<sup>2</sup>金凤实验室,重庆 401239 通信作者:刘勇, Email: liuyong@tmmu. edu. cn

【摘要】 目的 比较 Nuwacell<sup>®</sup>视网膜色素上皮(RPE)试剂盒分化法和基于烟酰胺(NIC)的定向分化法 对人诱导多能干细胞(hiPSC)向 RPE 细胞分化的差异。 方法 取第 16~18 代 CYP4V2 基因突变结晶样视网 膜色素变性患者外周血来源 hiPSC 系和未携带视网膜疾病相关突变的 hiPSC 系,培养4d,分别使用试剂盒分 化法和 NIC 定向分化法诱导获得 Nuwacell-RPE 和 NIC-RPE 细胞。于光学显微镜下观察诱导 3、4、5 周形成色 素细胞或色素灶的面积比例;采用分光光度法测定细胞色素度;采用实时荧光定量 PCR 和免疫荧光染色法检 测 RPE 细胞成熟标志物的表达;采用透射电子显微镜检测细胞极性结构;将诱导的 RPE 细胞与猪感光细胞 外节共培养48h,采用免疫荧光染色法检测吞噬视紫红质(RHO)标记的感光细胞外节数量;检测跨上皮电阻 值以评估细胞屏障功能。结果 Nuwacell 试剂盒法在分化3周形成色素细胞,分化5周时色素细胞面积比 例为(54.513±5.795)%;NIC 定向分化法在分化 4 周形成色素灶,分化 5 周时色素灶面积比例为(26.037± 8.489)%,2种方法分化5周时色素区域面积占比比较差异有统计学意义(P<0.05)。2种方法诱导的 RPE 细胞在连续培养 30 d 后均形成紧密排列的六边形结构, 色素度分别为(40.060±4.076)和(57.292± 2.588) pg/cell, 差异有统计学意义(P<0.001); 实时荧光定量 PCR 和免疫荧光染色结果显示, 与对应的 hiPSC 系相比,2种方法诱导的 RPE 细胞成熟标志基因 RPE65、BEST1、CRALBP 均表达升高。NIC-RPE 吞噬 RHO 阳 性外节数量显著高于 Nuwacell-RPE,差异有统计学意义(t=2.920, P=0.043); Transwell 小室培养 4 周, NIC-RPE 跨上皮电阻高于 Nuwacell-RPE, 差异有统计学意义(P<0.05); 连续传至第4代后, Nuwacell-RPE 部分丧 失原细胞特征,包括色素缺失、形态不规则及 RPE 标志物表达缺失,NIC-RPE 仍维持原形态特征。结论 试 剂盒分化法的分化效率、RPE 细胞得率较 NIC 定向分化法更高,细胞成熟度、吞噬和屏障功能不如 NIC 定向 分化法。

【关键词】 人诱导多能干细胞; 视网膜色素上皮; 分化效率; 细胞功能 基金项目: 重庆市自然科学基金 (CSTB2023NSCQ-LZX0166) DOI:10.3760/cma.j. cn115989-20241121-00319

## Comparison of retinal pigment epithelial differentiation efficiency from human induced pluripotent stem cells using kit-based and nicotinamide-induced methods

Tang Qinxue<sup>1</sup>, Zhang Fan<sup>2</sup>, Li Juan<sup>2</sup>, Liu Yong<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Ophthalmology, The First Affiliated Hospital of Army Medical University, Chongqing 400038, China;<sup>2</sup>Jinfeng Laboratory, Chongqing 401239, China

Corresponding author: Liu Yong, Email: liuyong@tmmu. edu. cn

[Abstract] Objective To compare the differentiation efficiency of human induced pluripotent stem cell (hiPSC)-derived retinal pigment epithelium (RPE) cells using the Nuwacell<sup>®</sup> RPE kit and nicotinamide (NIC)based differentiation methods. Methods Normal hiPSC lines and hiPSC lines from peripheral blood of two Bietti crystalline corneoretinal dystrophy (BCD) patients with *CYP4V2* gene mutation at passages 16–18, were cultured for 4 days, and were induced into Nuwacell-RPE and NIC-RPE cells using the kit-based differentiation method and the NIC differentiation method, respectively. The percentage of pigmented cells or pigment foci areas formed at 3,4, and 5 weeks after induction was observed and quantified under a light microscope. The cellular pigmentation level was measured by spectrophotometry. The expression of maturation markers in RPE cells was detected by real-time quantitative PCR and immunofluorescence staining. Cell polarity structures were examined by transmission electron microscopy. The induced RPE cells were co-cultured with porcine photoreceptor outer segments for 48 hours, and the number of rhodopsin (RHO)-labeled POS phagocytosed was quantified by immunofluorescence staining. Transepithelial electrical resistance was measured to evaluate the barrier function of the cells. According to the approval of the Ethics Committee of the First Affiliated Hospital of Army Medical University of China (No. [A] KY2023007), and peripheral blood from two BCD patients with CYP4V2 gene mutation was collected with written informed consent. Results The Nuwacell method formed pigmented cells at 3 weeks, with (54.513±5.795)% pigmentation at 5 weeks, while the NIC method formed pigment spots at 4 weeks, with (26.037 ± 8.489)% pigmentation at 5 weeks, with a statistically significant difference (P<0.005). After 30 days, both methods produced hexagonal RPE structures, with pigmentation levels of (40.060±4.076) and (57.292±2.588) pg/cell, respectively, and the difference was statistically significant (P < 0.001). PCR and immunofluorescence staining showed that increased expression of maturation marker genes RPE65, BEST1, and CRALBP induced by the two methods. NIC-RPE cells phagocytosed more RHO-labeled outer segments than Nuwacell-RPE, showing a statistically significant difference (t=2.920, P=0.043). After 4 weeks of culture in Transwell chambers, the transepithelial electrical resistance of NIC-RPE was higher than Nuwacell-RPE cells, demonstrating a statistically significant difference (P < 0.05). After continuous passage for 4 generations, Nuwacell-RPE partially lost its original cellular characteristics, including loss of pigmentation, irregular shape and loss of RPE marker expression, while NIC-RPE maintained its original morphologic features. Conclusions The Nuwacell kit method has higher differentiation efficiency and RPE cell yield than the NIC-directed differentiation method, and cell maturity, phagocytosis, and barrier functions are inferior to those of the NIC-directed differentiation method.

[Key words] Human induced pluripotent stem cells; Retinal pigment epithelium; Differentiation efficiency; Cell function

**Fund program**: Chongqing Natural Science Foundation (CSTB2023NSCQ-LZX0166) DOI:10.3760/cma.j.cn115989-20241121-00319

视网膜色素上皮(retinal pigment epithelium, RPE) 位于神经视网膜与脉络膜之间,主要功能包括为感光 细胞提供营养支持、促进视觉再生循环、维持血-视网 膜屏障等<sup>[1-2]</sup>。RPE 对感光细胞的存活至关重要,其 变性或凋亡常导致视网膜退行性疾病,如视网膜色素 变性和年龄相关性黄斑变性<sup>[3]</sup>。由于患者病理组织 样本获取较为困难, RPE 体外模型的开发和应用成为 研究相关疾病的关键手段<sup>[4]</sup>。人诱导多能干细胞 (human induced pluripotent stem cell, hiPSC)是一类具 有自我更新能力和多向分化潜能的细胞<sup>[5-6]</sup>。由 hiPSC 分化的 RPE 细胞保持与个体相同的遗传背景, 为疾病机制研究提供了高质量的疾病模型。

早期的 RPE 分化法多基于干细胞的自发分化<sup>[7]</sup>, 这种方法分化效率低、耗时长,且由于不同 hiPSC 的状 态差异,采用自发分化法往往不能很稳定地得到 RPE 细胞。随着对眼内发育机制的深入理解,研究人员尝 试通过添加各种生长因子或小分子化合物调控 RPE 细胞的分化过程。已有研究报道单独添加烟酰胺 (nicotinamide,NIC)可以提高 iPSC 向 RPE 的分化效 率<sup>[8-9]</sup>,同时联合转化生长因子(transforming growth factor,TGF)-β家族因子 Activin A 可以提高色素灶的 形成比例。市售 RPE 分化试剂盒(Nuwacell<sup>®</sup>)基于 NIC、Activin A 等经典诱导因子的调控,联合双重 SMAD 信号通路及成纤维细胞生长因子(fibroblast growth factor, FGF)通路抑制,促使 hiPSC 向原始神经 外胚层谱系分化,能以更快速、高效的方式获得 RPE 细胞。然而,单独或联合使用多种诱导因子的分化策 略对 RPE 细胞分化过程及后期成熟的功能特性是否 有不同的影响,尚未见系统的对比研究报道。本研究 拟对比基于 NIC 的定向分化法和 Nuwacell 试剂盒分 化法在 RPE 细胞分化中的效率及获得的 RPE 细胞功 能特性等方面的差异,探讨不同分化策略的适用场景, 为相关疾病研究和治疗提供实验基础。

#### 1 材料与方法

#### 1.1 材料

1.1.1 细胞来源 收集 2 例携带 *CYP4V2* 基因突变的结晶样视网膜色素变性(Bietti crystalline corneoretinal dystrophy, BCD)患者的外周血,委托上海中盛溯源生物科技有限公司进行 hiPSC 建系,获得 2 株患者来源的 BCD-iPSC;另一株未携带视网膜疾病相关突变的 NC-iPSC 系由上海中盛溯源生物科技有限公司惠赠。本研究经陆军军医大学第一附属医院伦理委员会审批[批文号:(A)KY2023007],并获得患者书面知情同意。

**1.1.2** 主要试剂及仪器 KnockOut<sup>™</sup> DMEM 培养 基、NIC、B-27 添加剂、KnockOut<sup>™</sup> 血清替代物、MEM 非必需氨基酸溶液、GlutaMAX添加剂、驴抗兔 Alexa Fluor<sup>™</sup> 555 荧光二抗(A-31572)、驴抗小鼠 Alexa Fluor<sup>™</sup> 488 荧光二抗(A-11001)(美国 Thermo 公司); Nuwacell<sup>®</sup> hPSC-RPE 分化试剂盒、ncTarget 干细胞培 养基(上海中盛溯源生物科技有限公司); TrypLE<sup>™</sup> express 酶(美国 Gibco 公司); Trizol 试剂、逆转录试剂 盒(RR047A)、TB Green<sup>®</sup> Premix Ex Taq<sup>™</sup> Ⅱ 试剂盒 (RR820A)(日本 Takara 公司);人工色素(M8631,美 国 Sigma 公司);抗体稀释液(丹麦 Dako 公司);免抗 紧密连接蛋白(zonula occludens, ZO)-1 多克隆抗体 (21773-1-AP, 武汉三鹰生物技术有限公司); 兔抗 RPE65 单克隆抗体(ab231782)、兔抗细胞视黄醛结 合蛋白 (cellular retinaldehyde binding protein, CRALBP) 单克隆抗体(ab243664)、鼠抗视紫红质 (rhodopsin, RHO)抗体(ab5417)(美国 Abcam 公 司); DAPI(北京索莱宝科技有限公司)。Transwell 小室(美国康宁公司);激光扫描共聚焦显微镜(LSM 980,德国蔡司公司);超微量分光光度计(德国 Implen 公司);酶标仪[美谷分子仪器(上海)有限公 司];实时荧光定量 PCR 仪[伯乐生命医学产品(上 海)有限公司];上皮电阻电压仪(EVOM2,美国世界 精密仪器公司);透射电子显微镜(HT7800,株式会 社日立制作所)。

#### 1.2 方法

1.2.1 细胞培养及诱导分化 (1)细胞培养 采用 ncTarget 干细胞培养基培养 hiPSC,每天更换培养基,每4~5 d 使用 EDTA 传代工作液传代,传代时加入终浓度为 10 µmol/L 的 Rock 通路抑制剂,次日更换新鲜培养基。(2)基于 NIC 的 RPE 定向分化法 参照文献[9]的方法,采用 ncTarget 干细胞培养基培养 hiPSC,当融合度>90%时,更换包含 78% Knockout DMEM、20% Knockout 血清替代物、1% MEM 非必需氨基酸溶液、1% GlutaMAX 添加剂及 800 mg NIC 的 KOSR 分化培养基,每2~3 d 换液。分化 4~5 周,在显微镜下使用针头剥取黑色素灶,接种至 matrigel 包

被的孔板上(P0代),继续使用 KOSR 分化培养基维持细胞扩增, 1周后更换为包含 70% DMEM、 30% Hams F-12及1倍b-27 添加 剂的 RPE 维持培养基继续培养 获得 NIC-RPE 细胞。(3)试剂盒 RPE 分化法 参考 Nuwacell<sup>®</sup> hPSC-RPE 分化试剂盒说明书,当 hiPSC 融合度>90% 时,更换分化 培养基A液,从第6天起可见致 密的 RPE 前体细胞形成;第6天起更换分化培养基B 液继续培养,从第10天开始,逐渐出现黄色团块样散 在分布的杂细胞,易与基质分离;第17天更换成熟培 养基C液;第23天加入纯化工作液去除杂细胞,第35 天可见呈六边形、具有色素分泌的成熟 RPE 细胞(P0 代),即 Nuwacell-RPE 细胞。2种分化法来源的 RPE 细胞均在培养4周后传至下一代。已有研究证实 *CYP4V2*基因突变不影响 iPSC 向 RPE 细胞分化<sup>[10]</sup>。 本研究在评估2种分化法的诱导效率时,为扩大样本 量,同时纳入 BCD 患者来源的 iPSC 与正常 iPSC;为排 除突变基因对细胞表型和功能分析的干扰,后续研究 中仅纳入正常 iPSC 系。NIC 分化法和试剂盒分化法 诱导及维持培养流程如图1所示。

1.2.2 诱导效率比较 选取 16~18 代的 BCD 来源和 正常 hiPSC,以 1.5×10<sup>4</sup>/cm<sup>2</sup> 接种至 6 孔板中。hiPSC 生长第 4 天起,分别按照 2 种分化法的流程开始诱导, 通过分化成功率和色素区域面积占比来评估 2 种分化 法的诱导效率。(1)分化成功率=分化成功次数/总分 化次数×100%。其中成功分化定义为诱导 35 d 后可 见典型色素上皮或色素灶形成。(2)通过 ImageJ 软件 对明场图像进行阈值分割分析,色素区域面积占比= 色素细胞或色素灶面积/总观察区域面积×100%。所 有数据来源于至少 3 次独立重复实验。

1.2.3 色素含量测定 将按照 2 种分化方案 P3 代培 养 7 d 和 30 d 的 RPE 细胞制成细胞悬液后计数,将各 组细胞悬液浓度统一稀释为 1×10<sup>6</sup>/ml。每组取 100 µl 细胞悬液,重悬于 100 µl 1 mol/L NaOH 中, 80 ℃下变性 10 min。配置 200 µg/ml 人工合成黑色 素,并倍比稀释至 6.75 µg/ml 作为标准品。通过酶标 仪测定波长 475 nm 处样品和标准品的吸光度 (absorbance, A)值,并将数据归一化为提取的总细胞 数量。实验独立重复 3 次。

1.2.4 免疫荧光染色检测 RPE 细胞特征蛋白表达 取 P3代 RPE 细胞在 Transwell 小室上生长 3 周,4%多



图 1 2种分化方案的诱导及维持培养流程示意图 hiPSC:人诱导多能干细胞;KOSR:KnockOut 血清替代物;RPE:视网膜色素上皮;NIC:烟酰胺

Figure 1 Schematic diagram of two differentiations method hiPSC: human induced pluripotent stem cells; KOSR: KnockOut serum replacement; RPE: retinal pigment epithelium; NIC: nicotinamide

聚甲醛固定 20 min,磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline,PBS)漂洗 3 遍,用镊子取出小室,沿边缘小心 切割下小室 膜片,平铺于玻片上。使用含 0.5% TritonX-100 PBS 溶液室温破膜 15 min,PBS 漂洗 3 遍; 加入 5%山羊血清封闭液,室温孵育 1 h;吸干封闭液 后分别加入 ZO-1(1:1 000)、RPE65(1:200)和 BEST1 (1:200)一抗,4℃孵育过夜;PBS 漂洗 3 遍,加入 Cy3 标记的二抗,室温孵育 1 h,PBS 漂洗;DAPI 避光染核 10 min,PBS 漂洗 3 遍;用抗荧光淬灭剂封片,激光扫 描共聚焦显微镜下观察细胞中 ZO-1、RPE65 和 BEST1 的荧光表达及定位。

1.2.5 实时荧光定量 PCR 检测 RPE 成熟基因、多能 干性基因表达 采用 Trizol 法提取 P3 代 RPE 细胞总 RNA,采用超微量分光光度计测得 RNA 浓度及纯度, 采用逆转录试剂盒逆转录成 cDNA。实时荧光定量 PCR 反应体系: SYBR Green 2X Premix 12.5 μl, 正反 向引物各 1.0 μl, cDNA 模板 2.0 μl。反应条件:95 ℃ 预变性 30 s;95 ℃ 变性 5 s,60 ℃ 退火及延伸 30 s,40 个循环。各基因引物序列见表 1。以 GAPDH 为内参, 采用 2<sup>-ΔΔCi</sup> 法计算各基因 mRNA 相对表达量。实验独 立重复 3 次。

表1 目的基因引物序列

	Table 1         Primer sequence of target genes
基因	引物序列(5'-3')
OCT4	正向: CCTCACTTCACTGCACTGTA
	反向:CAGGTTTTCTTTCCCTAGCT
SOX2	正向:CCCAGCAGACTTCACATGT
	反向:CCTCCCATTTCCCTCGTTTT
RPE65	正向:CAAGGCTGACACAGGCAAGA
	反向:TTGACGAGGCCCTGAAAAGA
BEST1	正向:CATGAGCTGGACCTCGTTGT
	反向:CCAACAGGGACACCTGCAAA
CRALBP	正向:GCTGCTGGAGAATGAGGAAA
	反向:GGCTGGTGGATGAAGTGGAT
GAPDH	正向:GTGGACCTGACCTGCCGTCT
	反向:GGAGGAGTGGGTGTCGCTGT

注:OCT4:八聚体结合转录因子;SOX2:SRY 相关 HMG 盒;RPE65:维 甲酸异构水解酶;BEST1:促动蛋白 1;CRALBP:细胞视黄醛结合蛋白; GAPDH:3-磷酸甘油醛脱氢酶

Note: OCT4: octamer-binding transcription factor 4; SOX2: SRY-related HMG box 2; RPE65: retinoid isomerohydrolase; BEST1: bestrophin-1; CRALBP: cellular retinaldehyde binding protein; GAPDH: glyceraldehyde-3phosphate dehydrogenase

**1.2.6** RPE 吞噬感光细胞外节功能检测 参考文献 [11] 的方法提取猪眼感光细胞外节(photoreceptor outer segment, POS)。P3 代 RPE 细胞在 Transwell 小

室上培养3周,与POS在37℃、5%CO<sub>2</sub>条件下共培 养48h,PBS清洗3~4次去除POS;加入RHO抗体 (1:200),于4℃过夜孵育,对RPE吞噬内化的POS 进行免疫荧光染色;同时采用荧光双染方法,加入ZO-1抗体(1:1000)来展示细胞形态。使用激光扫描共 聚焦显微镜Z轴层扫显示吞噬POS的位置。每组样 本选取上、中、下3个固定位置进行Z轴层面扫描成 像,通过最大强度投影法生成二维图像,统计POS数 量,取3个视野的平均值作为最终统计结果。

**1.2.7** 跨上皮电阻检测 参考文献[12]的方法,将 P3代NIC-RPE和Nuwacell-RPE细胞以 $1 \times 10^5$ /cm<sup>2</sup>的 密度接种在Transwell小室上;培养1周后形成紧密的 单层细胞,使用 EVOM2上皮电阻仪测量跨上皮电阻 (trans-epithelium electrical resistant, TER)。每组取同 一方向重复测量3次,取平均值。以仅含空白培养基 的Transwell小室的TER作为空白对照。TER=(实验 组TER=空白组TER)×0.33, TER 单位为 $\Omega \cdot cm^2$ , 0.33 cm<sup>2</sup>为Transwell小室膜细胞生长面积。

1.2.8 透射电子显微镜下观察 RPE 细胞超微结构 取 P3 代在 Transwell 小室培养 3 周的 NIC-RPE 和 Nuwacell-RPE 细胞,在 2.5%戊二醛中 4 ℃ 固定过夜, 将 PET 膜从小室轻柔切下,并切割成符合样品托槽的 大小。0.1 mol/L PBS 洗涤 2 次,1%四氧化锇室温固 定 2 h,0.1 mol/L PBS 洗涤,丙酮梯度脱水,环氧树脂 618 包埋。半薄切片定位,行厚度 40~50 nm 超薄切 片,常规采用 2% 醋酸铀和 2% 柠檬酸铅染色,于电子 显微镜下观察 RPE 细胞超微结构。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 21.0 统计学软件和 GraphPad 10.4.1 软件分别进行统计分析和作图。计量资料数据经 Shapiro-Wilk 检验证实呈正态分布,以 x±s 表示。2 种 分化法的成功率比较采用 Fisher 检验,2 种分化法在 不同诱导时间的色素区域面积总体差异比较均采用单 因素方差分析,组间两两比较采用 LSD-t 检验;2 种分 化法间的细胞产量、RPE 吞噬能力比较采用独立样本 t 检验;多组不同时间检测指标总体差异比较采用两 因素方差分析,组间比较采用 LSD-t 检验。采用双侧 检验,P<0.05 为差异有统计学意义。

#### 2 结果

2.1 试剂盒分化法与 NIC 定向分化法的 RPE 诱导效率比较

在正常人来源的 hiPSC 中,试剂盒分化法的 RPE 诱导成功率(6批次,成功率为100%)高于NIC定向分

化法(15 批次,成功率为 85.71%); 在 BCD 患者来源的 hiPSC 中, 2 种方法的诱导成功率均有所下 降,但试剂盒分化法的成功率(6 批次,为 66.67%)仍高于 NIC 定 向分化法(20批次,为55.56%)。 试剂盒分化法和 NIC 定向分化法 诱导的整体成功率分别为 83.33%和 68.57%, 差异无统计 学意义(P=0.466)。试剂盒分化 法获得 P0 代可冻存的 RPE 细胞 数量为 7.13±1.11,多于 NIC 定 向分化法的 4.90±0.81,差异有 统计学意义(t = 4.886, P < 0.001)。试剂盒分化法在诱导第 3 周,可见呈多边形的未成熟 RPE 细胞群,诱导第 4、5 周时色 素细胞形成面积比例分别为 (51.233±3.053)%和(54.513± 5.795)%;NIC 定向分化法诱导 4 周以上形成致密色素灶,诱导4、5 周时色素区域面积占比分别为 (22.290±10.670)%和(26.037±

8.489)%(图 2)。诱导第 4、5 周各不同分化方法组的
色素区域面积占比总体比较差异有统计学意义(F<sub>组别</sub>=43.227,P<0.005);与试剂盒分化法比较,NIC定向分化法各诱导时间点的色素区域面积占比均明显</li>
降低,差异均有统计学意义(均 P<0.05)(图 2)。</li>
2.2 试剂盒分化法与 NIC 定向分化法获得的 RPE 成
熟度比较

2.2.1 RPE 细胞色素度比较 2 种分化法来源的 RPE 传代后连续培养 1 个月,均呈现典型的多边形、 鹅卵石样排列特征,并伴有明显的黑色素分泌;试剂盒 分化诱导的 RPE 黑色素积累较 NIC 定向分化法少(图 3)。色素定量结果显示,各分化方法培养 7、30 d 的 RPE 色素含量总体比较,差异有统计学意义(F<sub>分组</sub> = 32.053,P<0.001;F<sub>时间</sub> = 647.356,P<0.001);各培养时间点 NIC 定向分化法细胞色素含量明显高于试剂 盒分化法,差异均有统计学意义(均 P<0.05)(表 2)。 2.2.2 RPE 细胞成熟标志物的表达比较 实时荧光 定量 PCR 结果显示,Nuwacell-RPE、NIC-RPE 和 hiPSC 中 *BEST1*、*RPE65*、*CRALBP*、*OCT4* 和 *SOX2* 基因 mRNA 相对表达量总体比较差异均有统计学意义(*F* = 27.792、 56.334、46.397、189.032、39.162,均 *P*<0.01);其中与



图 2 试剂盒分化法与 NIC 分化法在诱导 3 周、4 周时的典型细胞形态及色素区域形成率(×5,标 尺=100  $\mu$ m) A:试剂盒分化法在诱导 3 周时可见未成熟 RPE 细胞(白色圈),杂细胞呈团簇状 散在分布(红色箭头),诱导 4 周时,去除杂细胞后可见其脱离形成的空白区域(蓝色箭头);NIC 定向分化法在诱导 3 周无色素灶形成,仅存在散在分布的杂细胞团块(红色箭头),直到诱导 4 周 时形成色素灶(白色三角) 白色方框内展示虚线框内局部放大图(标尺=20  $\mu$ m) B:2 种分化 法诱导不同时间点的色素区域面积占比比较 F=43.227, P<0.05. 与同一时间试剂盒分化法比 较,"P<0.001(两因素方差分析,LSD-t 检验;n=3) NIC:烟酰胺

Figure 2 Typical cell morphology and pigmented area formation rate of two differentiation methods at 3 and 4 weeks of induction (×5, scale bar = 100  $\mu$ m) A; Immature RPE cells (white circles) were visible by the Nuwacell kit differentiation method at 3 weeks of induction, and mixed cells (red arrows) were scattered in clusters. At 4 weeks of induction , empty areas (blue arrows) formed after mixed cell detachment were visible. After 3 weeks of induction with the NIC differentiation method, no pigmented foci were formed, only scattered clusters of mixed cells (red arrows) were present. Pigmented foci were formed up to 4 weeks of induction (white triangles). The white box was a local magnified view of the dotted box (scale bar = 20  $\mu$ m) B; Comparison of pigmented area ratios between the two differentiation method at different induction time points F = 43.227, P < 0.05. Compared with Nuwacell kit differentiation method at corresponding time points, <sup>a</sup>P < 0.001 (Two-way ANOVA, LSD-*t* test; n = 3) NIC; nicotinamide



**图 3 光学显微镜下观察 2 种分化方案诱导的 RPE P3 代培养 1 个 月的图像**(×40,标尺=20 μm) 明场和相差图像显示 2 种分化方法 来源的 RPE 细胞均呈典型多边形鹅卵石样,细胞内含有大量色素颗 粒 RPE:视网膜色素上皮细胞;NIC:烟酰胺

Figure 3 Images of RPE P3 generation induced by two differentiation methods observed by light microscopy after one month of culture (  $\times$  40, scale bar = 20  $\mu$ m) Bright-field and differential interference contrast images showed that RPE cells derived from both differentiation methods exhibited typical polygonal cobblestone-like morphology with abundant pigment granules in the cytoplasm RPE: retinal pigment epithelium; NIC; nicotinamide

hiPSC 相比, Nuwacell-RPE 和 NIC-RPE 多能性基因 OCT4、SOX2表达均下调,差异均有统计学意义(均P< 0.05); Nuwacell-RPE 细胞中成熟标志物 RPE65、 BEST1 以及 CRALBP mRNA 表达水平低于 NIC-RPE 细胞,但差异均无统计学意义(均 P>0.05)(表3)。免 疫荧光染色结果显示, Nuwacell-RPE 和 NIC-RPE 细胞 均高度均一表达 RPE 细胞成熟标志物 ZO-1、RPE65、 CRALBP(图 4)。

2.3 试剂盒分化法与 NIC 定向分化法获得的 RPE 细胞功能比较

2.3.1 RPE 超微结构观察 透射电子显微镜下可见 2 种分化法获得的 RPE 均形成特征单层极性结构,细 胞顶端出现密集的微绒毛,黑素颗粒集中于细胞质上 方,细胞核定位于下方,细胞间形成紧密连接(图5)。

表 2 2 种分化法来源的 RPE 在不同培养时间点 细胞色素含量比较(x±s,pg/cell) Table 2 Comparison of pigment content in RPE derived

from two differentiation methods at different culture time points  $(\bar{x}\pm s, pg/cell)$ 

		( )10 /		
4日 모네	长木昌	培养不同时间点色素含量		
组加	件坐里 -	7 d	<b>30</b> d	
试剂盒分化法	3	$8.008 \pm 1.448$	40. <mark>060±4. 076</mark>	
NIC 定向分化法	3	8.717±2.173 <sup>a</sup>	57. 292±2. 588ª	

注: $F_{41,91}$  = 32.053,P<0.001; $F_{itjel}$  = 647.356,P<0.001.与相应时间点 试剂盒分化法比较,"P<0.001(两因素方差分析,LSD-t 检验) RPE:视 网膜色素上皮细胞;NIC:烟酰胺

Note :  $F_{\text{group}} = 32.053$ , P < 0.001;  $F_{\text{time}} = 647.356$ , P < 0.001. Compared with Nuwacell kit differentiation method at corresponding time points,  ${}^{a}P < 0.001$  (Two-way ANOVA, LSD-*t* test) RPE : retinal pigment epithelium ; NIC : nicotinamide

2.3.2 RPE 细胞吞噬功能与屏障功能 激光扫描共 聚焦显微镜层扫结果显示, RPE 细胞内化的 POS 定位 于细胞内部,试剂盒分化法和 NIC 定向分化法获得的

表 3 2 种分化法来源的 RPE 及 hiPSC 多能性基因及 RPE 标志基因 mRNA 相对表达量比较 $(\bar{x} \pm s)$ 

Table 3 Comparison of the relative mRNA expression levels of pluripotency genes and RPE marker genes in hiPSCs and RPE cells derived from two differentiation methods  $(\bar{x}\pm s)$ 

细胞类型	样本量	各目的基因 mRNA 相对表达量				
		BEST1	RPE65	CRALBP	OCT4	SOX2
Nuwacell-RPE	3	$0.758 \pm 0.063$	0.568±0.131	$0.536 \pm 0.078$	$0.026 \pm 0.004^{a}$	0.027±0.001 <sup>±</sup>
NIC-RPE	3	$0.896 \pm 0.267$	$0.741 \pm 0.082$	$0.774 \pm 0.156$	$0.017 \pm 0.010^{a}$	$0.054 \pm 0.003^{\circ}$
hiPSC	3	$0.001 \pm 0.000$	$0.002 \pm 0.000$	$0.003 \pm 0.000$	1.575±0.195	$1.395 \pm 0.375$
F 值		27.792	56.334	46.397	189.032	39.162
<i>P</i> 值		0.003	0.001	0.002	< 0.001	< 0.001

注:与 hiPSC 比较, "P<0.05(单因素方差分析,LSD-t 检验) RPE:视网膜色素上皮细胞;hiPSC:人诱导多能干细胞;NIC:烟酰胺;BEST1:促动蛋白1;RPE65:维甲酸异构水解酶;CRALBP:视黄醛结合蛋白;OCT4:八聚体结合转录因子;SOX2:SRY 相关 HMG 盒

Note: Compared with hiPSC, "P<0.05 (One-way ANOVA, LSD-t test) RPE: retinal pigment epithelium; hiPSC: human induced pluripotent stem cell; NIC: nicotinamide; BEST1: bestrophin-1; RPE65: retinoid isomerohydrolase; CRALBP: cellular retinaldehyde-binding protein; OCT4: octamer-binding transcription factor 4; SOX2: SRY-related HMG-box



图 4 试剂盒分化法和 NIC 定向分化法诱导的 RPE 特异性蛋白兔 疫荧光染色图(×500,标尺=50 μm) 2 种分化法来源的 RPE 细胞 均高表达 ZO-1(红色荧光),定位于细胞膜的紧密连接区域, CRALBP 和 RPE65 均高表达于细胞质(绿色荧光) ZO-1:紧密连接 蛋白 1;RPE65;维甲酸异构水解酶;CRALBP:细胞视黄醛结合蛋白; NIC:烟酰胺

Figure 4 Immunofluorescence staining images of RPE-specific protein markers in cells induced by two differentiation methods ( $\times$ 500, scale bar = 50 µm) RPE cells induced by both differentiation methods exhibited high expression of ZO-1 (red fluorescence), localized to the tight junction regions of the cell membrane, while CRALBP and RPE65 were highly expressed in the cytoplasm (green fluorescence) ZO-1; zonula occludens-1; RPE65; retinoid isomerohydrolase; CRALBP; cellular retinaldehyde-binding protein; NIC; nicotinamide

RPE 吞噬 RHO 阳性 POS 的数量分别为 151.67 ± 33.53 和 247.33 ± 45.79, 差异有统计学意义(t = 2.920, P=0.043)(图 6)。

2 种分化法的 TER 增长趋势均显示出时间依赖 性。2 种分化法诱导的 RPE 培养 1~4 周的 TER 总体 比较差异均有统计学意义(*F*<sub>组别</sub> = 73.013, *P*<0.001; *F*<sub>时间</sub> = 2 428.425, *P*<0.001);其中试剂盒分化法与 NIC 定向分化法诱导的 RPE 细胞在培养第 1、2 周时

> 的 TER 差异均无统计学意 义(均 P>0.05);在培养第 3、4 周时,NIC 定向分化法 诱导 RPE 细胞的 TER 显 著高于试剂盒分化法,差异 均有统计学意义(均 P< 0.05)(表4)。

> 2.4 各分化 RPE 细胞特 性维持

将各分化 RPE 细胞连 续传代至 P4 代后,Nuwacell-RPE 细胞形态明显变化, 部分细胞变为不规则长梭 形,失去原有的多边形铺路 石样特征,色素分泌缺失。



**图 5 透射电子显微镜下各分化 RPE 超微结构特征**(×4 000,标尺 = 2 μm) 2 种分化方案获得的 RPE 在 Transwell 膜上培养均可形成单 层极性结构,可见位于胞质顶端的色素颗粒(MG),顶端微绒毛(AM),位于基底部的细胞核(N),基底膜(BM),以及相邻细胞间的 紧密连接(TJ),图中星号标注微绒毛,箭头示缝隙连接 NIC:烟酰胺;RPE:视网膜色素上皮细胞

Figure 5 Ultrastructural characteristics of differentiated RPE observed by transmission electron microscopy (×4 000, scale bar = 2  $\mu$ m) RPE cells induced by both differentiation protocols formed polarized monolayer structures on Transwell membranes. Pigmented granules (MG) and apical microvilli (AM) localized at the apical cytoplasm, basally positioned nuclei (N), basement membrane (BM), and tight junctions (TJ) between adjacent cells were seen. Asterisks denoted microvilli, and arrows indicated gap junctions NIC: Nicotinamide; RPE: Retinal pigment epithelial



**图 6 2种分化法来源 RPE 细胞吞噬功能比较** A:激光扫描共聚焦显微镜 Z 轴层扫正交视图 (×500,标尺=20 μm) 吞噬的 POS 定位于细胞内部,NIC-RPE 内 POS 荧光标记数量多于 Nuwacell-RPE,绿色荧光为 RHO 标记的 POS(白色箭头),红色荧光为 ZO-1 蛋白 B:2 个组 RPE 吞噬 POS 荧光数量比较 与 Nuwacell-RPE 比较,\*P<0.05(独立样本 t 检验,n=3) RPE;视网膜 色素上皮;NIC:烟酰胺;ZO-1:紧密连接蛋白 1;RHO:视紫红质;POS:感光细胞外节 Figure 6 Comparison of phagocytic function of RPE cells from two differentiation methods

A: Confocal microscopy Z-axis orthogonal view (× 500, scale bar = 20  $\mu$ m) Phagocytosed POS were localized within the cells, with a higher amount of POS fluorescence labeling in NIC-RPE compared to Nuwacell-RPE. Green fluorescence represented POS (white arrows) labeled with RHO, and red fluorescence indicated ZO-1 protein B: Comparison of the number of POS phagocytosed by RPE cells in the two groups Compared with Nuwacell-RPE, <sup>a</sup>P<0.05 (Independent samples *t*-test, *n* = 3) RPE: retinal pigment epithelium; NIC: nicotinamide; ZO-1: zonula occludens-1; RHO: rhodopsin; POS: photoreceptor outer segments

免疫荧光染色结果显示,部分 Nuwacell-RPE 细胞 RPE65 表达缺失,ZO-1 染色显示细胞连接呈现非规则 形态;相比之下,NIC-RPE 细胞仍维持规则形态,细胞 排列紧密,正常分泌色素,RPE65 正常均一表达 (图7)。

### 3 讨论

hiPSC 来源的 RPE 是人类视网膜退行性疾病中体外建模、药物筛选和细胞移植治疗的工具<sup>[13-14]</sup>。早

期获取 hiPSC-RPE 多采用自发分化法,但其诱导周期 长达 8~12 周,且效率仅约为 1%<sup>[7]</sup>。近年来,随着发 育信号通路研究的进展,研究者开发了大量更高效、定 向的 RPE 分化策略<sup>[15-18]</sup>。然而,不同分化策略来源 的 RPE 在成熟度和功能特征上存在差异,影响其在疾 病研究中的应用方向。本研究系统分析了商业化的 RPE 试剂盒分化法与基于 NIC 的定向分化法在诱导 效率、RPE 细胞得率及细胞功能特性上的差异,结果 表明试剂盒分化法的分化效率和细胞得率高于 NIC 定向分化法,但其细胞成熟度、吞噬功能及屏障功能不 如 NIC 定向分化法。

在胚胎发育过程中, RPE 起源于前神经外胚层, 其分化受到多个信号通路的调控,尤其是骨形态发生 蛋白(bone morphogenetic protein, BMP)、FGF 和 Wnt/ β-Catenin 通路的抑制对视泡形成至关重要<sup>[3,8]</sup>。NIC 通过抑制酪蛋白激酶 1,促进早期眼域标志基因 *LHX2*、*PAX6* 和 *RAX* 的表达并引导 hiPSC 向 RPE 分

> 化<sup>[18-19]</sup>。相较而言, Nuwacell 试 剂盒分化法采用了一种综合策 略,结合 BMP 抑制剂和 TGF-β/ 激活素抑制剂来抑制 SMAD 信号 传导,诱导前神经外胚层形成,并 联合细胞因子和改良的小分子化 合物组合,包括 Activin A、NIC、前 列腺素 E2,协同调节 WNT/β-Catenin、FGF 等信号通路,从而提 高 RPE 诱导效率和色素形成 率<sup>[20]</sup>。

RPE 细胞的成熟标志包括形成铺路石样外观、色素沉着和成熟标志物的表达<sup>[21-22]</sup>。Michelet等<sup>[17]</sup>研究发现,RPE 细胞色素沉着水平与血管内皮生长因子和色素上皮衍生因子分泌量之间呈正相关性,表明色素度较高的 RPE

细胞具有更高的极性和成熟度。本研究发现,2种分 化法诱导的 RPE 细胞均高表达 RPE 成熟标志物,但 通过试剂盒分化法诱导的 RPE 细胞色素沉积度低于 NIC 定向分化法,且 NIC 分化法来源的 RPE 细胞的吞 噬功能和屏障功能显示出更高的水平。这可能与诱导 策略的不同有关。NIC 定向分化法在后期培养阶段额 外添加 B-27 因子,能够模拟体内微环境,促进 RPE 细 胞的成熟及功能表达。有研究报道,B-27 能参与调节 神经细胞间的连接,促进突触结构与功能形成,有助于

表 4 2 种分化法来源的 RPE 细胞不同培养时间点 TER 比较( $\bar{x}\pm s, \Omega \cdot cm^2$ ) Table 4 Comparison of TER between RPE from two differentiation methods at different culture time points ( $\bar{x}\pm s, \Omega \cdot cm^2$ )

40 Bil	样本量	培养不同时间点 TER				
纽加		1 周	2 周	3 周	4 周	
试剂盒分化法	3	26.447±2.731	47.987±4.024	102.547±8.356	231.440±7.201	
NIC 定向分化法	3	27.377±2.535	$54.220 \pm 1.771$	116.907±6.736 <sup>a</sup>	$281.320\pm 3.037^{a}$	
注:F <sub>组别</sub> =73.013,P<0.001;F <sub>时间</sub> =2428.425,P<0.001。与相应时间点试剂盒分化法比较,*P<						

0.05(两因素方差分析,LSD-t 检验) RPE:视网膜色素上皮;TER:跨上皮电阻;NIC:烟酰胺 Note: *F*<sub>group</sub> = 73.013, *P* < 0.001; *F*<sub>time</sub> = 2 428.425, *P* < 0.001. Compared with the Nuwacell kit

differentiation method at the corresponding time points, <sup>a</sup>*P*<0.05 (Two-way ANOVA, LSD-*t* test) RPE: retinal pigment epithelium; TER; trans-epithelial electrical resistance; NIC: nicotinamide



图 7 免疫荧光染色观察 2 种分化法来源的 P4 代 RPE 细胞形态及 RPE 标志蛋白表达(×50,标 尺=200 μm) A:光学显微镜下可见 Nuwacell-RPE 细胞间混杂形态不规则的杂细胞,缺乏色素 分泌;NIC-RPE 细胞呈均一多边形铺路石样形态,细胞质内有大量色素颗粒 B:免疫荧光图像示 试剂盒法分化的 RPE 细胞正常表达细胞膜定位的 ZO-1(红色荧光),杂细胞形态欠规则,缺乏 RPE65 表达(绿色荧光);而 NIC 法分化的 RPE 细胞均高表达 ZO-1 及 RPE65 白色方框内为局 部放大图像(×500,标尺=20 μm) NIC:烟酰胺; RPE;视网膜色素上皮; ZO-1:紧密连接蛋白 1; RPE65:维甲酸异构水解酶

Figure 7 Morphology and expression of RPE marker proteins in RPE cells at passage 4 derived from two differentiation methods observed by immunofluorescence staining ( $\times$  50, scale bar = 200 µm) A: Under the light microscope, Nuwacell-RPE had mixed cells in irregular shape, which lacked pigment secretion. In contrast, NIC-RPE exhibited a uniform polygonal cobblestone morphology with abundant pigment granules in the cytoplasm B:Immunofluorescence images showed that Nuwacell-RPE expressed normal membrane-localized ZO-1 (red fluorescence) with irregular morphology and lack of RPE65 expression (green fluorescence). In contrast, NIC-RPE uniformly expressed both ZO-1 and RPE65 The white solid boxes indicated magnified regions ( $\times$  500, scale bar = 20 µm) NIC: nicotinamide; RPE: retinal pigment epithelium; ZO-1: zonula occludens-1; RPE65: retinoid isomerohydrolase

维持细胞极性及神经网络构建<sup>[23]</sup>。Nuwacell 试剂盒的分化培养基中包含 Activin A、NIC 等促进色素灶形成和细胞扩增的细胞因子,但其可能缺乏维持培养阶段对 RPE 细胞功能性成熟的调控。

维持 RPE 细胞在体外扩增的稳定性是构建可靠 疾病模型的前提。既往研究报道, RPE 细胞在连续传 代过程中易发生上皮-间充质转化,表现为色素脱失、 上皮样形态改变<sup>[24]</sup>。本研究中, Nuwacell 试剂盒诱导 现杂细胞混杂;而 NIC 分化法诱 导的 RPE 细胞在传至 P4 代后仍 保持较高的同质性,成熟标志物 表达均一,表现出更好的稳定性。 这种差异可能源于2个方面:首 先2种分化策略的细胞纯化方式 及诱导后期杂细胞的清除程度不 同, Nuwacell 试剂盒法侧重于分 化流程的标准化与可控性,采用 操作上更为便捷、时间可控的胰 蛋白酶消化法,本质是通过杂细 胞与 RPE 细胞的黏附力差异实 现细胞纯化。有研究报道,某些 RPE 分化体系中形成的成纤维细 胞等间充质源性杂细胞与 RPE 细胞具有相似的基质黏附性,单 纯采用酶消化法时,纯化率仅为 37.44%<sup>[25]</sup>。该纯化方法对杂细 胞清除作用有限,而低代次的 RPE 细胞增殖力较强<sup>[12]</sup>,可能掩 盖了杂细胞的生长,使其在培养 早期不易被识别到。相较而言, NIC 分化法通过人工挑取色素灶 的方式纯化细胞,尽管流程耗时 增加,且对于操作者的精细技术 要求较高,但可基于对细胞色素 特征的筛选标准,最大程度地保 证 RPE 细胞的纯度<sup>[7]</sup>。其次,2 种分化策略的后期维持培养基成 分上有所不同。Nuwacell 培养基 主要依赖碱性成纤维细胞生长因 子等基础生长因子支持细胞增 殖,在 RPE 维持培养时期缺乏维 持稳定性的成分;而 NIC 分化法 体系在 RPE 维持培养阶段引入

的 RPE 细胞在扩增至 P4 代时出

支持神经细胞生长的 B-27 补充剂。有研究报道,B-27 能通过降低 RhoA 活性并诱导 F-肌动蛋白重排,从而 抑制原代培养的猪 RPE 细胞中上皮-间充质转化的发 生<sup>[24]</sup>;推测这种成分可能帮助 RPE 细胞维持体外扩 增的稳定性。

分化效率、细胞纯度及成熟度是选择 RPE 分化策略的关键指标。Nuwacell 试剂盒法具有高效率、标准 化流程和较高的细胞得率,更适用于高通量的药物筛 选和开发等应用。目前已有研究报道 Nuwacell 试剂 盒分化法应用于 GMP 级别的大规模细胞生产<sup>[20]</sup>。相 比之下,NIC 定向分化法虽然诱导效率较低,但能获得 纯度和成熟度更高的 RPE 细胞,更适用于视网膜退行 性疾病的体外建模及疾病机制研究,如构建年龄相关 性黄斑变性患者来源的 hiPSC 分化的 RPE 细胞<sup>[26]</sup>, 可再现玻璃膜疣沉积和 RPE 细胞萎缩等病理特征,为 致病机制探索提供可靠的体外研究基础。综上,商业 化 RPE 分化试剂盒法与 NIC 定向分化法在诱导效率、 RPE 细胞特性和功能上存在差异,研究者应根据研究 需求选择合适的分化策略。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

作者贡献声明 唐沁雪:实验设计及实施、数据统计分析、文章撰写; 张帆、李娟:指导研究、论文修改;刘勇:研究指导、论文审阅及定稿

#### 参考文献

- Lakkaraju A, Umapathy A, Tan LX, et al. The cell biology of the retinal pigment epithelium [J/OL]. Prog Retin Eye Res, 2020:100846[2024-11-16]. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32105772.DOI: 10.1016/j.preteyeres.2020.100846.
- Maeda T, Takahashi M. iPSC-RPE in retinal degeneration; recent advancements and future perspectives [J/OL]. Cold Spring Harb Perspect Med, 2023, 13 (8): a041308 [2024-11-16]. http://www. ncbi. nlm. nih. gov/pubmed/36690464. DOI: 10. 1101/cshperspect. a041308.
- [3] Gupta S, Lytvynchuk L, Ardan T, et al. Progress in stem cells-based replacement therapy for retinal pigment epithelium: *in vitro* differentiation to *in vivo* delivery [J]. Stem Cells Transl Med, 2023, 12(8):536-552. DOI:10.1093/stcltm/szad039.
- Bharti K, den Hollander AI, Lakkaraju A, et al. Cell culture models to study retinal pigment epithelium-related pathogenesis in age-related macular degeneration [ J/OL ]. Exp Eye Res, 2022, 222 : 109170
  [ 2024-11-16]. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/35835183. DOI:10.1016/j.exer.2022.109170.
- [5] Van Gelder RN, Chiang MF, Dyer MA, et al. Regenerative and restorative medicine for eye disease [J]. Nat Med, 2022, 28 (6): 1149-1156. DOI:10.1038/s41591-022-01862-8.
- [6] Bertolotti E, Neri A, Camparini M, et al. Stem cells as source for retinal pigment epithelium transplantation [J]. Prog Retin Eye Res, 2014, 42: 130-144. DOI: 10.1016/j. preteyeres. 2014. 06.002.
- [7] Vugler A, Carr AJ, Lawrence J, et al. Elucidating the phenomenon of HESC-derived RPE: anatomy of cell genesis, expansion and retinal transplantation[J]. Exp Neurol, 2008, 214 (2): 347 - 361. DOI: 10. 1016/j. expneurol. 2008. 09. 007.
- [8] 段豪云,李文静,贾艳妮,等.尼克酰胺对人胚胎干细胞向神经嵴细胞分化的诱导作用[J].中华实验眼科杂志,2022,40(12):1141-1148.DOI:10.3760/cma.j.cn115989-20200624-00450.
  Duan HY, Li WJ, Jia YN, et al. Promoting effect of nicotinamide on generation of neural crest stem cells derived from human embryonic stem cells[J]. Chin J Exp Ophthalmol, 2022, 40(12):1141-1148. DOI:10.3760/cma.j.cn115989-20200624-00450.
- [9] Idelson M, Alper R, Obolensky A, et al. Directed differentiation of human embryonic stem cells into functional retinal pigment epithelium cells[J]. Cell Stem Cell, 2009, 5 (4) : 396-408. DOI: 10. 1016/j. stem. 2009. 07. 002.
- [10]Zhang Z, Yan B, Gao F, et al. PSCs reveal PUFA-provoked

mitochondrial stress as a central node potentiating RPE degeneration in Bietti's crystalline dystrophy[J]. Mol Ther, 2020, 28(12): 2642-2661. DOI:10.1016/j.ymthe. 2020.07.024.

- [11] Farnoodian M, Bose D, Khristov V, et al. Cell-autonomous lipidhandling defects in Stargardt iPSC-derived retinal pigment epithelium cells[J]. Stem Cell Reports, 2022, 17 (11) : 2438 - 2450. DOI: 10. 1016/j. stemcr. 2022. 10. 001.
- [12] Wu W, Zeng Y, Li Z, et al. Features specific to retinal pigment epithelium cells derived from three-dimensional human embryonic stem cell cultures-a new donor for cell therapy [J/OL]. Oncotarget, 2016, 7(16): 22819 - 22833 [2024 - 11 - 18]. http://pubmed.ncbi.nlm. nih. gov/27009841. DOI:10.18632/oncotarget. 8185.
- [13] Hall JC, Paull D, Pébay A, et al. Human pluripotent stem cells for the modelling of retinal pigment epithelium homeostasis and disease; a review[J]. Clin Exp Ophthalmol, 2022, 50(6): 667-677. DOI: 10. 1111/ceo. 14128.
- [14] Limnios IJ, Chau YQ, Skabo SJ, et al. Efficient differentiation of human embryonic stem cells to retinal pigment epithelium under defined conditions [J/OL]. Stem Cell Res Ther, 2021, 12(1): 248 [2024-11-18]. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33883023.DOI: 10.1186/s13287-021-02316-7.
- [15] Surendran H, Soundararajan L, Reddy K VB, et al. An improved protocol for generation and characterization of human-induced pluripotent stem cell-derived retinal pigment epithelium cells [ J/OL ].
  STAR Protoc, 2022, 3 (4) : 101803 [ 2024 11 18 ]. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/36386870. DOI: 10. 1016/j. xpro. 2022. 101803.
- [16] Hazim RA, Karumbayaram S, Jiang M, et al. Differentiation of RPE cells from integration-free iPS cells and their cell biological characterization [J/OL]. Stem Cell Res Ther, 2017, 8 (1) : 217 [2024 11 18]. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28969679.DOI: 10.1186/s13287-017-0652-9.
- [17] Michelet F, Balasankar A, Teo N, et al. Rapid generation of purified human RPE from pluripotent stem cells using 2D cultures and lipoprotein uptake-based sorting [J/OL]. Stem Cell Res Ther, 2020, 11(1):47[2024-11-20]. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/ 32014053. DOI:10.1186/s13287-020-1568-3.
- [18] Maruotti J, Sripathi SR, Bharti K, et al. Small-molecule-directed, efficient generation of retinal pigment epithelium from human pluripotent stem cells [J/OL]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2015, 112(35):10950-10955[2024-11-20]. http://www.ncbi.nlm.nih. gov/pubmed/26269569. DOI:10.1073/pnas. 1422818112.
- [19] Zhang H, Ryu D, Wu Y, et al. NAD<sup>+</sup> repletion improves mitochondrial and stem cell function and enhances life span in mice [J]. Science, 2016, 352(6292): 1436-1443. DOI:10.1126/science. aaf2693.
- [20] Zhang H, Su B, Jiao L, et al. Transplantation of GMP-grade human iPSC-derived retinal pigment epithelial cells in rodent model: the first pre-clinical study for safety and efficacy in China [J/OL]. Ann Transl Med, 2021, 9(3): 245 [2024-11-20]. http://www.ncbi.nlm.nih. gov/pubmed/33708872. DOI:10.21037/atm-20-4707.
- [21] Bennis A, Jacobs JG, Catsburg L, et al. Stem cell derived retinal pigment epithelium: the role of pigmentation as maturation marker and gene expression profile comparison with human endogenous retinal pigment epithelium[J]. Stem Cell Rev Rep, 2017, 13(5):659-669. DOI:10.1007/s12015-017-9754-0.
- [22] Liu S, Xie B, Song X, et al. Self-formation of RPE spheroids facilitates enrichment and expansion of hiPSC-derived RPE generated on retinal organoid induction platform [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2018, 59(13):5659-5669. DOI:10.1167/iovs.17-23613.
- [23] Kovalevich J, Langford D. Considerations for the use of SH-SY5Y neuroblastoma cells in neurobiology[J]. Methods Mol Biol, 2013, 1078: 9-21. DOI:10.1007/978-1-62703-640-5\_2.

- [24] Tian H, Xu JY, Tian Y, et al. A cell culture condition that induces the mesenchymal-epithelial transition of dedifferentiated porcine retinal pigment epithelial cells[J]. Exp Eye Res, 2018, 177:160-172. DOI: 10.1016/j. exer. 2018. 08. 005.
- [25] Regha K, Bhargava M, Al-Mubaarak A, et al. Customized strategies for high-yield purification of retinal pigment epithelial cells differentiated from different stem cell sources [J/OL]. Sci Rep, 2022, 12(1):15563
   [2024-11-20]. http://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36114268.DOI: 10.1038/s41598-022-19777-2.
- [26] Sharma R, George A, Nimmagadda M, et al. Epithelial phenotype restoring drugs suppress macular degeneration phenotypes in an iPSC model[J/OL]. Nat Commun, 2021, 12 (1) : 7293 [2024-11-20]. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/34911940.DOI:10.1038/ s41467-021-27488-x.

(收稿日期:2025-01-20 修回日期:2025-04-10)

(本文编辑:张宇 骆世平)

・病例报告・

# 泪腺淋巴增生性病变发展为 MALT 淋巴瘤 1 例

杜一帆'吕小辉'王楠'张璇'王金锦'孙梅'何珊'王宁利'马建民'

<sup>1</sup>首都医科大学附属北京同仁医院 北京同仁眼科中心 北京市眼科研究所 眼科学与视觉科学北京市重点实验室,北京 100005;

<sup>2</sup>山东省潍坊医学院附属医院眼科中心,潍坊 261000;<sup>3</sup>泰安市中心医院眼科,泰安 271000

吕小辉、张璇为北京同仁医院进修生

通信作者:马建民,Email:jmma@sina.com

#### 基金项目:北京市医院管理中心登峰计划(DFL20190201);北京市自然科学基金(7182038)

Lymphoproliferative lesion of the lacrimal gland developing into MALT lymphoma; a case report

Du Yifan<sup>1</sup>, Lyu Xiaohui<sup>2</sup>, Wang Nan<sup>1</sup>, Zhang Xuan<sup>3</sup>, Wang Jinjin<sup>1</sup>, Sun Mei<sup>1</sup>, He Shan<sup>1</sup>, Wang Ningli<sup>1</sup>, Ma Jianmin<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Beijing Tongren Hospital, Capital Medical University, Beijing Tongren Eye Center, Beijing Institute of Ophthalmology,

Beijing Key Laboratory of Ophthalmology and Visual Sciences, Beijing 100005, China;<sup>2</sup> Ophthalmological Center of Affiliated Hospital of

Weifang Medical College, Weifang 261000, China;<sup>3</sup> Department of Ophthalmology, Tai'an Central Hospital, Tai'an 271000, China

Lyu Xiaohui and Zhang Xuan were visiting scholars at Beijing Tongren Hospital

Corresponding author: Ma Jianmin, Email: jmma@sina. com

Fund program: Beijing Hospitals Authority' Ascent Plan (DFL20190201); Beijing Natural Science Foundation (7182038)

DOI:10. 3760/cma. j. cn115989-20210223-00129

患者男,44岁,因右眼上眼睑肿胀于2020年12月在北京 同仁医院就诊。数月前曾于当地医院诊断为右眼眶内肿物并 行右眼眶内肿物摘除术,术后病理检查结果示右泪腺淋巴组织 不典型增生,以滤泡增生为主(图1A)。随后患者右眼睑肿胀 复发,左眼睑也出现类似症状,故收治入院。患者全身一般情 况良好,眼科检查:双眼视力 1.0,眼压右眼 16 mmHg(1 mmHg= 0.133 kPa), 左眼 15 mmHg。双眼上眼睑肿胀, 泪腺区可扪及 肿物,无触痛,右眼眉弓颞侧可见长约4 cm 弧线形皮肤切口瘢 痕,双眼上睑轻度下垂伴眼球轻度突出。结膜轻度充血,余双 眼眼前节及眼底检查未见明显异常。既往首次术后2个月复 查眼眶 MRI, T1WI 可见双侧泪腺区长 T1 信号, T2WI 可见短 T2 信号,信号强度相似,增强后可见肿物均匀强化,考虑淋巴增生 性病变或炎性病变可能性大;本次术前眼眶 MRI 扫描结果同样 显示,双侧泪腺区可见长 T1 短 T2 的均匀等信号肿物,增强后 可见均匀强化,边界较清晰,但肿物累及范围较前次略扩大 (图 2)。入院后进行免疫系统相关实验室检查,结果显示患者 类风湿因子偏高(56.10 IU/ml),抗核抗体、动态红细胞沉降 率、C反应蛋白、免疫球蛋白 G(immunoglobulin G, IgG)、IgA、 IgM、抗 PR3 抗体、抗 MPO 抗体等均未见异常。入院后患者先 后接受右、左眼眶内肿物摘除术。术中见右眼眶外侧壁骨质有

局限性破坏。手术完整切除双眼泪腺区肿物,大体观下可见右 眼肿物呈灰白色,质脆,边界欠清,内有坏死灶,大小约 2.5 cm×1.5 cm×1.6 cm; 左眼肿物呈灰白色, 质脆, 边界欠清, 大小约 2.0 cm×1.6 cm×1.0 cm。双眼肿物组织病理学检查结 果相似,光学显微镜下可见肿物内弥漫性淋巴细胞增生,细胞 排列紧密,形状较为均一,大小基本相同,结果符合淋巴组织增 生性病变(图1B)。免疫组织化学染色检查结果显示,右眼泪 腺区肿瘤细胞高表达 Bel-2、CD10、CD20、CD21、CD23、CD5、 CD79α、PAX-5 因子, 而 Bcl-6、CD3、CD43、CD45RO、CyclinD1、 SOX-11 等因子未见明显表达;左眼泪腺区肿瘤细胞高表达 Bel-2、CD10、CD20、CD21、CD23、CD43、MUM-1 因子,而 Bel-6、CD3、 CD5、CyclinD1、SOX-11 等因子未见明显表达(图 1C、D)。最终 病理诊断为黏膜相关淋巴组织 (mucosa-associated lymphoid tissue, MALT)淋巴瘤。同时, 根据非霍奇金淋巴瘤 Ann Arbor 分期标准和其他检查结果,该淋巴瘤处于A类I期,为疾病发 展的早期阶段。术后患者恢复好,1周后出院。根据肿瘤的性 质,建议患者转血液内科进行治疗。随访5个月,未见肿瘤 复发。

**讨论**:本例患者1年前右眼病变泪腺的病理报告显示淋巴 组织不典型增生,以滤泡增生为主,而此次病理诊断为 MALT

Chinese Medical Association Publishing House