

# 视网膜干细胞研究现状

孙涛 柯碧莲 许迅

**【摘要】** 干细胞是当今细胞生物学乃至整个生命科学研究的主要热点之一,视网膜干细胞的研究近年来颇有进展,这对于治疗眼科临床的一些疾病,如遗传性视网膜变性、原发或继发性视网膜变性疾病、老年性黄斑病变等,提供了具有较大发展潜力的新途径。现就视网膜干细胞的发现与鉴定,体外培养、增殖、分化以及移植方面的研究进展作一综述。

**【关键词】** 视网膜; 干细胞; 细胞培养; 综述文献

中图分类号:R321.59

视觉科学的目的之一在于有效预防和消灭致盲性眼病,恢复患者的视功能。随着眼科临床和基础研究的进步,一些致盲性眼病,如角膜病、白内障等感染性和屈光间质混浊性致盲性眼病,可以得到有效的控制和治疗。但与此同时,一些眼底疾病,如遗传性视网膜色素变性、原发或继发性视网膜变性疾病、老年性黄斑病变等的致盲率有上升趋势,这些疾病用目前的技术和办法难以逆转,造成了巨大的经济和社会负担。如何有效的治疗这些疾病成为了视觉科学工作者的攻关目标。视网膜干细胞在体外培养、增殖、分化与移植方面的研究进展,为我们最终有效的治疗这些眼病,恢复患者的视功能提供了一个良好的契机。

## 1 干细胞的概念

干细胞是在生物个体的生长和发育中起“主干”作用的原始细胞,是具有自我更新、增殖和多向分化潜能的细胞群体,即这些细胞可以通过细胞分裂维持自身细胞群的大小,同时又可以进一步分化为各种不同的组织细胞,从而构成机体各种复杂的组织器官。干细胞可分为胚胎干细胞和成体干细胞等。胚胎干细胞是来自早期胚胎(4~5 d)的内细胞群,可以分化为来自三个胚层(中、内、外)的各种细胞。因而,胚胎干细胞的分化和增殖构成机体发育的基础。成体干细胞是未分化的细胞,埋藏在已分化的特定组织中,能够自我更新,并产生由它起源的组织特化细胞。其主要功能是在一定程度上维持细胞功能的稳定状态,即动态平衡,代替由于损伤、衰老或疾病死亡的细胞。所以,成体干细胞是机体组织和器官修复再生的基础。过去 10 年中,科学家发现多种组织中存在成体干细胞,而视网膜干细胞就是其中之一。

## 2 视网膜干细胞的研究现状

### 2.1 视网膜干细胞的发现与鉴定

视网膜发育来源于神经外胚叶,是大脑的延伸,中枢神经系统的一部分。中枢神经系统中存在具有干细胞特性的细胞,

称为神经干细胞。那么,视网膜中是否也存在神经干细胞呢?早在上世纪五十年代,人们就发现鱼和两栖类动物的视网膜能够终身生长。随后的研究采用细胞世代分析方法证实了新生的视网膜神经元均源于视网膜的周边区域——睫状边缘带(ciliary marginal zone)<sup>[1-3]</sup>。接着,在鸟类视网膜周边部的睫状边缘带也发现了不断增殖分化的视网膜干细胞,这与鱼和两栖类动物极为相似,区别在于急性损伤并不会加快鸟类视网膜干细胞的增殖速度<sup>[4,5]</sup>。近年来的研究证实,胚胎鼠视网膜包含着在体外具有干细胞特性的祖细胞,这些细胞除可增殖并表达神经外胚层标记外,还具有多向分化潜能<sup>[6,8]</sup>。以前,人们一直认为成年哺乳动物视网膜没有再生功能,但 Vincent 等<sup>[7]</sup>发现在成年小鼠眼内存在干细胞,充当这一角色的是单纯色素睫状缘细胞(single pigmented ciliary margin cells),它在体外可分裂、增殖并分化为视网膜特殊的细胞类型,如视杆细胞、双极细胞和 Muller 胶质细胞,这同时也说明了与非哺乳类脊椎动物的眼生发区具有同源性<sup>[8]</sup>。而在最近的研究中,研究人员通过免疫组化方法进一步发现,在人类胚胎和成人的视网膜及睫状体的某些部位均表达神经干细胞特异性抗原——神经巢蛋白(nestin),同时这些部位的细胞在体外培养中显示出自我更新、增殖和多向分化的潜能,从而推断人类视网膜干细胞同样存在<sup>[9]</sup>。

### 2.2 视网膜干细胞的体外培养与鉴定

以机械分离联合酶学消化的方法获取的胚胎视网膜干细胞在特定的培养基中表现出自我更新、增殖和多向分化的潜能。在无血清、含有外源性生长因子(EGF 或 bFGF)的培养基中,视网膜干细胞能分裂、增殖而形成神经球样的细胞团,这些细胞对增生细胞标记物——BrdU 和神经干细胞特异性抗原——nestin 均表现为免疫阳性反应,表明培养的细胞为未达终末分化、神经外胚层来源的幼稚细胞。将这些细胞球分离成单细胞进行传代培养,细胞又可由单细胞迅速长成 nestin 阳性的多细胞克隆球,显示细胞具有自我更新的干细胞特点。将培养液中的生长因子换成 1% 牛胎血清(FBS)后,无论是原代细胞还是传代细胞均长出神经细胞样突起,并能表达神经丝蛋白(neurofilament protein)、微管相关蛋白-2(microtubule-associated protein 2)或胶质纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic

protein, 等神经细胞或神经胶质细胞特异性抗原, 说明细胞具有向神经元和神经胶质细胞双系分化的多向潜能的特性。研究中同时也发现, 培养细胞能分化为某些视网膜细胞类型, 例如对感光细胞标记物——视紫红质(rhodopsin)和 recoverin 的阳性表达, 而无长突细胞的标记物——syntaxin 则几乎不表达<sup>[9-12]</sup>。值得指出的是, 尽管在特定培养基中分化的不同小鼠种群的视网膜干细胞对成熟视网膜细胞标记物具有免疫反应性, 但在总体分化上与该种群正常个体的视网膜细胞的表型和比率存在显著差异<sup>[9]</sup>, 而且在长时间的体外培养后, 例如细胞传代达到 8~12 代后, 会渐渐失去其视网膜的组织特异性<sup>[11]</sup>, 因而并不能代表原位细胞发展形成的视网膜细胞形态学。

### 2.3 视网膜干细胞定向分化的研究

视网膜干细胞获得细胞决定(cell determination), 发生细胞分化, 最终形成多种神经元和神经胶质细胞的过程, 严格按照特定的时间与空间顺序, 形成复杂而有序的基因与蛋白调控网络。在特定的环境因素和时空条件下, 表达特定的基因网络, 如: 配对盒基因-6(Pax6)、脊柱动物同源基因(Vax)、Eph 家族受体相互作用蛋白基因(Ephrin-B)、T 形盒基因(Tbx)、骨形态生成蛋白基因(Bmp)等, 通过特定的信号转导系统, 如转化生长因子- $\beta$ /Sma 和 Mad 同族蛋白信号转导系统(TGF- $\beta$ /SMAD)、Janus 激酶信号转导递质与转录活化因子(JAK/STAT)信号转导系统、Notch 信号转导系统、Ca<sup>2+</sup> 信号转导系统等, 使多能视网膜干细胞向视网膜前体细胞与终末细胞分化。Fischer 等向鸡眼玻璃体腔内注射胰岛素和(或) FGF-2, 研究眼内注射生长因子是否刺激 Müller 胶质细胞增生产生新的神经元。发现二者联合作用引起 Müller 胶质细胞共表达视网膜前体细胞转录因子 Pax6 和 Chx10, 从而得出结论: 胰岛素和 FGF-2 联合应用能刺激 Müller 胶质细胞停止分化, 增生产生新的神经元, 提示外源性生长因子可用来刺激中枢神经系统的胶质细胞生成神经元<sup>[13]</sup>。

利用持续性微速摄影视频显微镜(time-lapse video microscopy)对鼠单个细胞集落在无性培养基中的增殖和分化进行观察, 发现视网膜干细胞在增殖和分化过程中均表现出可塑性。相同条件下, 细胞分裂周期和次数存在差异, 来自同一个视网膜前体细胞的两个子细胞可以分化为神经元和神经胶质细胞两种类型, 而神经元往往要早于胶质细胞的形成, 这些说明细胞自身因素在细胞发育过程中的重要作用<sup>[11]</sup>。而将新生鼠视网膜细胞与胚胎鼠视网膜干细胞共同培养发现, 视网膜干细胞表达感光细胞标记物的阳性率明显增高, 这提示外界微环境的改变对干细胞向感光细胞转化产生了促进作用。所以, 局部细胞与细胞间相互作用的外部因素在细胞发育过程中的作用同样是不可忽视的<sup>[12, 11]</sup>。至于细胞内外因素何者为主, 何者为次, 抑或两者相辅相成, 不分主次, 则有待于科研的进一步发掘和探讨。

### 2.4 视网膜干细胞的移植研究

受体免疫监视系统是胚胎组织移植能否成功的关键。无论是同种还是异种视网膜移植, 眼防御免疫监视的屏蔽特性促进了植片的成活, 所以最大限度地保持受体眼解剖结构的完整,

对于移植成活具有非常重要的意义。现有两种手术通路到达视网膜下腔: 经玻璃体和经巩膜。经巩膜通路会破坏脉络膜血管和 Bruch 膜, 导致视网膜屏障破坏和受体早期致敏; 而经玻璃体通路, 视网膜屏障的解剖结构没有破坏, 且手术野清晰, 更为可取<sup>[11]</sup>。

治疗性视网膜干细胞移植是基于这些细胞对受体视网膜细胞起到营养作用, 并能恢复视网膜细胞的数量。其优越性表现在: (1) 有迁移能力, 能远距离迁移至病变部位; (2) 能整合于宿主组织, 外源基因表达稳定, 维持时间长; (3) 有修复功能, 能分化未成熟细胞修复病损组织; (4) 自身干细胞移植, 避免产生免疫排斥反应。现已证实, 移植入受体视网膜下腔的供体胚胎视网膜干细胞能继续分裂、分化并形成特征性的玫瑰花球状细胞团, 感光细胞位于其内, 其外是双极细胞、放射状胶质细胞和无长突细胞<sup>[15, 16]</sup>。移植细胞能够移行进入机械性损伤或变性的受体视网膜内, 并表现出多样化的过程。进入视网膜内层(神经节细胞层、内丛状层和内核层)的细胞数目明显多于进入视网膜外层(外丛状层和外核层)的细胞数目, 形态学和免疫组织化学研究均证实这些细胞能分化为神经元和神经胶质细胞, 而且进入视网膜外层的移植细胞能表达感光细胞的特异性标记物, 进入视网膜内层的移植细胞却表达双极细胞和无长突细胞的特异性标记物。体外培养的视网膜干细胞几乎不分化形成无长突细胞, 但移植后的视网膜干细胞却分化形成了无长突细胞。这些现象均说明局部细胞与细胞间相互作用在干细胞分化中起着重要的作用<sup>[17, 11, 6]</sup>。但是, 这些分化而成的感光细胞是否能够与第二级神经元形成功能性突触? 它们对供体视网膜的功能是否具有代偿作用? 这些疑问都还没有明确的答案。

综上所述, 视网膜干细胞在体外培养、增殖、分化和移植方面的研究进展, 为视网膜结构和功能重建带来了曙光。虽然现在体外控制干细胞分化的技术尚未成熟, 触发和调控干细胞分化的机制仍不明了, 而免疫排斥也仍然是干细胞移植治疗中的一大障碍。另外, 胚胎干细胞研究还不可避免地受到伦理问题的困扰。但是, 相信随着时间的推移和科学技术的进步, 上述问题将会得到圆满的解决。

### 3 参考文献

- 1 Wetts R, Serbedzija GN, Fraser SE. Cell lineage analysis reveals multipotent precursors in the ciliary margin of the frog retina. *Dev Biol*, 1989, 136:254-263.
- 2 Johns PR. Growth of the adult goldfish eye. II. source of the new retinal cells. *J Comp Neurol*, 1997, 176:343-357
- 3 Perron M, Kanekar S, Vetter ML, et al. The genetic sequence of retinal development in the ciliary margin of the xenopus eye. *Dev Biol*, 1998, 199:185-200.
- 4 Fischer AJ, Reh TA. Identification of a proliferating marginal zone of retinal progenitors in postnatal chickens. *Dev Biol*, 2000, 220:197-210.
- 5 Reh TA, Fisher AJ. Stem cells in the vertebrate retina. *Brain, Behavior & Evolution*, 2001, 58: 296-306.
- 6 David MC, Jim AR, James ET, et al. Survival and differentiation of cultured retinal progenitors transplanted in the subretinal space of the rat. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000, 268:812-846.
- 7 Vincent T, Brenda LKC, Bernard JC, et al. Retinal stem cells in the adult mammalian eye. *Science*, 2000, 287:2032-2036.
- 8 Ahmad I, Tang L, Pham H. Identification of neural progenitors in the adult mammalian eye. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000, 270:517-521.

- 9 Yang P, Seiler MJ, Aramant RB, et al. In vitro isolation and expansion of human retinal progenitor cells. *Exp Neurol*. 2002, 177:326-331.
- 10 Jensen AM, Raff MC. Continuous observation of multipotential retinal progenitor cells in clonal density culture. *Dev Biol*. 1997, 188:267-279.
- 11 Tadamichi A, Masatoshi H, Joe A, et al. Different characteristics of rat retinal progenitor cells from different culture periods. *Neuroscience Letters*. 2003, 341:213-216.
- 12 Ahmad I, Dooley CM, Thoreson WB, et al. In vitro analysis of a mammalian retinal progenitor that give rise to neurons and glia. *Brain Res*. 1999, 831:1-10.
- 13 Fischer AJ, Vincent T. Exogenous growth factors stimulate the regeneration of ganglion cells in the chicken retina. *Dev Biol*. 2002, 251:367-379.
- 14 Cepko CL. The roles of intrinsic and extrinsic cues and bHLH genes in the determination of retinal cell fates. *Curr Opin Neurobiol*. 1999, 9:37-46.
- 15 Bergstrom A, Ehinger B, Wilke K, et al. Transplantation of embryonic retina to the subretinal space in rabbits. *Exp Eye Res*. 1992, 55:29-37.
- 16 Rajesh KS, Berndt E. Cell proliferation in retinal transplants. *Cell Transplantation*. 1997, 6:141-148.
- 17 David MC, Ani VD, Xing Z, et al. Transplantation of ocular stem cells; the role of injury in incorporation and differentiation of grafted cells in the retina. *Vision Res*. 2003, 13:937-947.

(收稿日期:2004-06-11)  
(本文编辑:韦纯义)

## 细胞外基质与脉络膜新生血管

朱洁 王雨生 惠延年

**【摘要】** 脉络膜新生血管(CNV)是引起视力障碍的重要原因之一。在 CNV 形成过程中,多种细胞外基质(ECM)分子通过与整合素(integrin)结合,调节细胞内信号通路,影响血管内皮细胞在 ECM 中移行和侵入。这一过程可被尿激酶样纤维蛋白水解酶激活物(uPA)和基质金属蛋白酶(MMPs)的蛋白水解作用加强,也受金属蛋白酶组织抑制剂(TIMPs)的调控。研究 CNV 发生过程中 ECM 的作用,将为预防 CNV 的生成提供新的思路。

**【关键词】** 脉络膜新生血管化; 细胞外基质; 整合素; 尿激酶型纤溶酶原激活物; 基质金属蛋白酶; 综述文献

中图分类号:773.4

脉络膜新生血管(CNV)与许多眼底疾病有关,常累及黄斑区,引起反复出血、渗出和瘢痕形成,是引起视力障碍的重要原因之一。细胞外基质(ECM)在组织中占有相当比例,可以影响细胞的形态、分化、移行和增生,维持组织的生理结构和生物学功能,在新生血管形成过程中起着一定的作用。近来关于 CNV 的研究已成为热点,但其形成机制尚未阐明。目前已证实,损伤 Bruch 膜、扰乱视网膜色素上皮(RPE)细胞的 ECM、或扰乱内源性抑制剂,是 CNV 生成的条件<sup>[1]</sup>。Bruch 膜及其周围基质的变化,以及基质金属蛋白酶(MMPs)的活化是 CNV 发生的前期重要步骤<sup>[2]</sup>,表明 ECM 在 CNV 形成过程中也有重要作用。

### 1 ECM 成分与 CNV

ECM 主要包括胶原蛋白(collagen)、纤连蛋白(FN)、层连蛋白(LN)、玻连蛋白(VN)、Ⅷ因子、凝血酶反应蛋白(TSP)、细胞粘素(TN)以及弹性蛋白(elastin)等多种成分,与血管生成因子和抗血管生成因子一样,可以通过不同通路对新生血管生长进行调控。研究发现,在老年性黄斑变性(AMD)患眼的 CNV 膜标本的 ECM 中广泛存在大量的细胞粘素-C(TN-C)<sup>[3]</sup>,并

且表达丰富的包含外部结构域 B 的纤连蛋白重组异构体<sup>[4]</sup>。表明 ECM 成分在 CNV 生成过程中有一定的作用。

凝血酶反应蛋白-1(TSP-1)是一种由内皮细胞、平滑肌细胞、血小板和单核细胞等分泌的多功能蛋白,是新生血管的天然抑制剂,可以抑制由多种新生血管刺激剂诱导的血管生成和内皮细胞的增生和移行。体外培养的 RPE 细胞可产生并释放 TSP-1,在体外和体内都可以观察到 TSP-1 在 RPE 细胞胞浆内的聚集。RPE 细胞产生 TSP-1 受到细胞增生状态和(或)细胞密度的影响。TSP-1 由 RPE 细胞在其增生期产生,可以加强可溶性血浆糖蛋白、FN 和纤维蛋白原刺激 RPE 细胞释放血管内皮细胞生长因子(VEGF)的作用<sup>[5]</sup>。

### 2 ECM 受体与 CNV

ECM 受体是细胞与 ECM 间相互作用的桥梁,介导细胞与基质间的相互作用。目前发现的 ECM 受体主要包括整合素(integrin)、选择素(selectin)和细胞间黏附分子(ICAM)等多个家族。其中整合素在 CNV 生成过程中起着主要作用。

在激光诱发的 CNV 模型中,激光光凝后 1 d 即可观察到损伤部位的 RPE 细胞、脉络膜血管内皮细胞和炎性细胞中 ICAM-1 和 E-选择素(E-selectin)被大量的诱导产生,表明在 CNV 产生之前即有与新生血管生成有关的 ICAM-1 和 E-selectin 的表达<sup>[6]</sup>。在激光诱发的小鼠 CNV 模型中,ICAM-1 缺乏的小鼠病理性荧光素渗漏显著减少,CNV 的发生面积也

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30371516);教育部留学回国人员科研启动基金资助项目(2004);第四军医大学科技创新工程项目(CX02A021);第四军医大学西京医院科技创新基金资助项目(XJCX04M003)  
作者单位:710032 西安,第四军医大学西京医院眼科,全军眼科研究所  
通讯作者:王雨生, E-mail: wangys@fmmu.edu.cn