

干细胞在视神经损伤修复中的应用

张敬学 综述 王宁利 马建民 审校

Research advance in application of stem cells in optic nerve regeneration

Zhang Jingxue, Wang Ningli, Ma Jianmin. Beijing Tongren Eye Center, Beijing Tongren Hospital, Capital Medical University, Beijing 100730, China

Abstract Lots of blinding diseases are caused by retinal ganglion cells apoptosis, but there is no the effective and ideal therapy in clinic currently. Recent study showed that stem cells can be an alternative renewable source of retinal ganglion cells, and they may be potential to repair the visual function. These results provide a new model of optic nerve regeneration for the treatment of these blinding diseases. But, some problems in clinical applications are waiting for further solving. Applications of stem cells in optic nerve regeneration is reviewed in this paper.

Key words retinal ganglion cell; stem cell; optic nerve regeneration; transplantation

摘要 许多致盲性眼病是由视网膜神经节细胞(RGCs)损伤造成的,目前临床上缺乏有效的治疗方法。最近的研究显示干细胞可以替代或再生 RGCs,从而有望修复受损的视功能。这些结果提供了新颖的视神经再生模式,但具体到临床应用,仍存在一系列问题需要解决。就应用干细胞再生视神经的研究进展进行综述。

关键词 视网膜神经节细胞; 干细胞; 视神经再生; 移植

分类号 R 774 **文献标识码** A **文章编号** 1003-0808(2009)11-1044-04

视神经损伤是许多眼部疾病所导致视功能损害共同的作用环节,严重时会造成患者视神经的萎缩和视功能的丧失。临床上导致视神经损伤的疾病有多种,如青光眼^[1]、视神经顿挫伤、视神经管骨折^[2]等。尽管对视神经损伤的治疗开展了大量研究工作,但其临床实际疗效不尽人意。视网膜神经节细胞(retinal ganglion cells, RGCs)的丢失是视神经损伤导致视神经萎缩和盲的共同途径。由于人类 RGCs 属于中枢神经元,不能去分化替代已丢失的细胞。因此,如何对已发生损伤的 RGCs 及萎缩的视神经进行有效的逆转治疗一直是眼科界面临的难题之一。采用细胞替代治疗,将有功能的细胞代替损伤的 RGCs,从而恢复视觉功能,这是一个极具潜力的治疗方法。由于干细胞具有持续增生的能力和多向分化的潜能,已被认为是神经移植的细胞来源。但其临床应用仍存在一些问题,如首先需要明确干细胞的增生、移行、分化及建立功能连接的能力等^[3]。就干细胞在视神经疾病中的应用研究进行综述。

1 干细胞来源

由于不是所有类型的干细胞都可被诱导成为可以治疗青光眼所需的细胞类型,为此,干细胞的来源是决定其能否成为受损 RGCs 替代细胞的一个主要因素。已有多种不同种类的干细胞或祖细胞被鉴定为可用于 RGCs 的替代治疗(表 1)。

表 1 可以用于 RGCs 替代治疗的干细胞

	细胞来源	易获得	扩增能力	分化能力	免疫排斥
胎儿视网膜细胞	胚胎	否	中度	视网膜系细胞	存在
胚胎干细胞	胚胎	是	高	全能(所有成体细胞)	存在
间充质干细胞	成体	是	依赖年龄	接近全能	无
视网膜干细胞	成体	否	低	视网膜系神经元细胞	无
神经干细胞	成体	否	中度	多种神经元细胞	无

胚胎干细胞(embryonic stem cells, ESCs)由于其体外具有接近无限增生的能力,并能定向分化成为具有典型结构和功能的神经元,从而被作为研究的重点。早在 1981 年,小鼠 ESCs 即被从小鼠胚胎中成功分离,它在体外可以长期不断自我更新,并且能够自发地分化形成内、中、外 3 个胚层不同类型的后代细胞^[4]。

作者单位:100730 北京,首都医科大学附属北京同仁医院眼科中心
通讯作者:王宁利 (Email: wningli@trhos.com)

Thomson 等^[5]率先成功分离和克隆了人 ESCs, 并成功建立了细胞系。众多研究表明: ESCs 可以分化成为视网膜祖细胞, 能够形成形态类似 RGCs 和表达 RGCs 特性的细胞, 且可以与宿主视网膜整合^[6-11]。然而, 该类细胞存在着一些不足: (1) 伦理问题的争论。(2) 如果不能对其移植后的增生能力进行调控, 就会存在着形成畸胎瘤的威胁^[12]。(3) 免疫排斥问题仍未解决。

另一种同样具有应用潜力的细胞是来源于成体的干细胞。它们在正常个体微环境中保持静默, 在某些条件作用或因子刺激下可以进一步分化。最近研究显示, 在成年哺乳动物视网膜中也有这种细胞存在, 称为视网膜干细胞 (retinal stem cells, RSCs), 其可以存在于色素睫状体边缘区域^[13-14], 也可以存在于视网膜的胶质细胞, 如 Müller 细胞^[15-16]。这两类 RSCs 在体内不会自我更新, 但是都可以在体外大量增生并分化成为多种视网膜神经元, 包括 RGCs^[13, 15]。它们来自患者本身, 不存在类似 ESCs 的不足之处。但是, RSC 的分化能力能否可以提供足够数量的目的细胞进行视功能的修复; 以及从患者自身得到的细胞是否在移植前就已发生病理损害, 移植后能否具有健康细胞一样的功能, 这些问题目前仍未解决。

2 干细胞的分化及移植

在过去的 20 年里, ESCs 定向诱导分化成视网膜神经细胞的技术已经日益成熟, 通过添加适当的生长因子或外源诱导剂, 如视黄酸 (retinoic acid, RA)、神经生长因子 (nerve growth factor, NGF)、成纤维细胞生长因子 (fibroblast growth factor, FGF)、胰岛素样生长因子 1 (insulin-like growth factor-1, IGF-1) 等^[17-19], ESCs 可以定向分化为特定的细胞系, 包括神经元表型。而这种促进作用很大程度上取决于外源性因子所使用的浓度和所选择的时间。最近, 有关 ESCs 体内移植研究进展迅速。Meyer 等^[10]应用绿色荧光蛋白 (green fluorescent protein, GFP) 示踪小鼠 ESCs, 体外诱导分化后移植入小鼠玻璃体腔内, 观察见所移植细胞分布于整个视网膜, 呈现神经元样结构, 并表达 β -III tubulin、NeuN、Calretinin、cPKC- α 等视网膜神经元蛋白标志物, 说明移植的供体细胞可在宿主视网膜中存活、整合及分化。Lamba 等^[11]对人类 ESCs 诱导分化系统依照视网膜发展的条件进行了完善, 结果使 80% 以上的干细胞转化成为神经祖细胞, 并进一步诱导其表达 HuC/D、Neurofilament-M、Tuj-1 等神经元细胞标志物; 同时通过研究细胞对接受谷氨酸盐和 NMDA 刺激的反应,

可以观察到钙离子的交换, 此结果提示分化的细胞已经具有成熟视网膜神经元样功能。

RSCs 在正常视网膜的微环境下处于相对静默状态。它们正常不会产生 RGCs, 但在有益的环境下可以分化为 RGCs。由色素睫状上皮分离的干细胞可以分化成由光感受器细胞到 RGCs 所有视网膜细胞谱系^[14]。通过对两栖类和鱼类动物的视神经再生研究, 发现 RGCs 分化可能与一些信号分子的调节有关。Moshiri 等^[20]发现 RSCs 分化能力的激活, 可能与 Wnts 和 Shh 信号途径在睫状体边缘区域的高表达相关。最近, Nickerson 等^[21]的研究进一步发现, 小鼠此区域的 RSCs 在 RGCs 损伤后可上调 Chx10、recovering 以及 nestin 的表达。另一自体干细胞治疗来源为 Müller 细胞。尽管初始不是神经元, 但 Müller 细胞的干细胞特性为视网膜神经元再生指出了新的方向。Fischer 等^[16]对鸡视网膜的研究发现, 在损伤或外源因子诱导下, Müller 细胞可以增生、分化, 产生新的神经元和胶质细胞。Das 等^[22]指出哺乳动物的视网膜 Müller 细胞也有此特性, 只是这种特性在正常视网膜中被抑制了。在激活 Notch 和 Wnt 信号通路后, Müller 细胞的干细胞特性被激活, 可增生分化产生神经元。最新文献报道显示, 已将 Müller 细胞的这种干细胞特性应用于青光眼研究。Bull 等^[23]将人 Müller 细胞移植到大鼠青光眼模型眼内, 观察细胞存活 2~3 周, 可表达 PSA-NCAM、GFAP、 β -III tubulin 等标志物, 但发现移植的细胞很难移行入视网膜; 通过进一步研究, 应用软骨素 ABC 或促红细胞生成素 (erythropoietin, EPO) 改变视网膜微环境, 可以使细胞移行入视网膜, 但数量不多。

3 临床应用的挑战

3.1 干细胞移植在临床上应用的条件

3.1.1 免疫排斥问题 使用大量免疫抑制药物固然可以保证移植成功, 但会引起许多不良反应, 如机会性感染、药物毒性反应、移植后淋巴组织增生、恶性肿瘤等。随着治疗性克隆研究的进步, 为这些问题的解决提供了新的方向。Tabar 等^[24]报道应用治疗性克隆技术治疗实验鼠帕金森氏症获得成功。研究中给患帕金森氏症实验鼠移植了其自身皮肤细胞克隆产生的 ESCs 来源的神经细胞, 实验鼠的病情出现明显改善, 并且无免疫排斥反应, 该实验证实了克隆来源干细胞具有临床应用的潜能, 为治疗性克隆的研究展现了美好的前景; Takahashi 等^[25]将 oct4、sox2、c-myc 和 Klf4 等 4 个基因导入小鼠成纤维细胞, 使其逆转为具有

ESCs 特性的多潜能干细胞,由此揭开了体细胞再程序化新的一幕,也为人类提供了全新的 ESCs 来源。

3.1.2 细胞移行及与宿主视网膜的整合 细胞移行尽管已经有十年的研究,仍然没有更好的眼内移植方法。大量的细胞通过针头注射入玻璃体或视网膜下区域后,由于内外界膜的障碍却不能进入视网膜或者是离开注射位点。最新研究显示,应用一种胶质细胞毒性药物来改变视网膜外界膜形态,使外界膜暂时性被打开,该实验为细胞移行指出了方向^[26]。此外,近年来组织工程学的进步提示可在体外进行细胞的三维组织培养,将细胞种在组织材料上,以组织的形式进行移植,使其更具有功能性^[27]。

3.1.3 神经元轴突的再生 许多研究指出由于移植细胞缺乏神经轴突导向性生长的能力,结果导致无功能性连接网络的建立。目前在该领域也取得了一些进展,Stupp 等^[28]通过离体实验证实,大鼠晶状体上皮细胞和视网膜共同培养后,可以显著诱导 RGCs 轴突定向性生长,并促进轴突再生。在小鼠的实验中, Park 等^[29]发现在去除 PTEN/mTOR 生长通路中的 2 个蛋白抑制物后,发生损伤的视神经中的神经元轴突会在数周内重新长出来。

3.1.4 增生调控 研究表明细胞增生可以按照指数性数量变化来增加移植物的尺寸,这就会带来畸胎瘤形成的危险。因此,应当在细胞移植前将有增生能力的未分化干细胞去除,仅移植所需要的目的细胞,有望对此问题的解决提供一定的借鉴作用。目前可以应用 Percoll 非梯度密度离心法^[30]、免疫磁珠、流式细胞仪等设备对细胞进行筛选。

移植神经元如何与脑部建立功能性连接是干细胞替代治疗中最为复杂的难题。但是,令人欣慰的是临床上患者在出现视功能损害之前已经有部分 RGCs 丢失,为此,只需修复部分数量的神经元与脑部的功能连接,就能够在很大程度上改善受损的视功能^[31]。

4 干细胞应用研究的展望

应用细胞移植使视神经再生是一个新的领域,仍存在许多难点,许多预测在目前都是不可确定的。主要问题为:(1)需要更多地了解干细胞分化增生的条件。掌握参与分化过程中的细胞因子,应用基因分析测定诱导细胞由多能增生阶段转变为分化阶段的基因,并确定其准确的作用时间,这样才可以得到所需要的目的细胞。(2)需要了解视网膜微环境对细胞的作用,以保证移植后细胞不会遭到级联作用的损害而迅速死亡。一些研究显示细胞移植前进行基因修饰或给

予神经营养因子,均可以起到保护移植细胞的作用^[32]。(3)对两栖类和鸡类动物的自发视神经再生系统的研究,有助于找到抑制人类视网膜再生的机制^[31]。我们可以大胆假设,人类也存在视网膜再生能力,只是由于某种抑制机制的存在而被关闭。也许将来只需要将某些基因转入或利用细胞因子诱导,就可以激活机体视网膜内在的视神经再生机制。

相信不久的将来,通过基础和临床众多学科共同努力,干细胞移植有可能会为视神经损伤的修复提供一种全新的治疗手段,从而改善全世界数百万人的健康状况。

参考文献

- 1 Quigley HA, Broman AT. The number of people with glaucoma worldwide in 2010 and 2020 [J]. *Br J Ophthalmol*, 2006, 90(3): 262 - 267
- 2 Wilhelm H. Traumatic optic neuropathy [J]. *Laryngorhinootologie*, 2009, 88(3): 194 - 203
- 3 Lovell-Badge R. The future for stem cell research [J]. *Nature*, 2001, 414(6859): 88 - 91
- 4 裴雪涛. 干细胞生物学 [M]. 北京: 科学出版社, 2003: 19 - 24
- 5 Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts [J]. *Science*, 1998, 282(5391): 1145 - 1147
- 6 Tropepe V, Hitoshi S, Sirard C, et al. Direct neural fate specification from embryonic stem cells: A primitive mammalian neural stem cell stage acquired through a default mechanism [J]. *Neuron*, 2001, 30(1): 65 - 78
- 7 Zhao X, Liu J, Ahmad I, et al. Differentiation of embryonic stem cells into retinal neurons [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002, 297(2): 177 - 184
- 8 Meyer JS, Katz ML, Maruniak JA, et al. Neural differentiation of mouse embryonic stem cells in vitro and after transplantation into eyes of mutant mice with rapid retinal degeneration [J]. *Brain Res*, 2004, 1014(1-2): 131 - 144
- 9 Hara A, Niwa M, Kumada M, et al. Intraocular injection of folate antagonist methotrexate induces neuronal differentiation of embryonic stem cells transplanted in the adult mouse retina [J]. *Brain Res*, 2006, 1085(1): 33 - 42
- 10 Meyer JS, Katz ML, Maruniak JA, et al. Embryonic stem cell-derived neural progenitors incorporate into degenerating retina and enhance survival of host photoreceptors [J]. *Stem Cells*, 2006, 24(2): 274 - 283
- 11 Lamba DA, Karl MO, Ware CB, et al. Efficient generation of retinal progenitor cells from human embryonic stem cells [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(34): 12769 - 12774
- 12 Arnold S, Klein H, Semkova I, et al. Naturally selected embryonic stem cells induce tumor formation after long-term survival following engraftment into the subretinal space [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2004, 45(12): 4251 - 4255
- 13 Tropepe V, Coles BL, Chiasson BJ, et al. Retinal stem cells in the adult mammalian eye [J]. *Science*, 2000, 287(5460): 2032 - 2036
- 14 Xu H, Sta Iglesia DD, Kielczewski JL, et al. Characteristics of progenitor cells derived from adult ciliary body in mouse, rat, and human eyes [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2007, 48(4): 1674 - 1682
- 15 Limb GA, Salt TE, Munro PM, et al. In vitro characterization of a spontaneously immortalized human Müller cell line (MIO-M1) [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2002, 43(3): 864 - 869
- 16 Fischer AJ, Reh TA. Potential of Müller glia to become neurogenic retinal progenitor cells [J]. *Glia*, 2003, 43(1): 70 - 76
- 17 Schuldiner M, Eiges R, Eden A, et al. Induced neuronal differentiation of human embryonic stem cells [J]. *Brain Res*, 2001, 913(2): 201 - 205
- 18 Zhang SC, Wernig M, Duncan ID, et al. In vitro differentiation of

transplantable neural precursors from human embryonic stem cells [J]. Nat Biotechnol, 2001, 19 (12): 1129 - 1133

19 Reubinoff BE, Itsykson P, Turetsky T, et al. Neural progenitors from human embryonic stem cells [J]. Nat Biotechnol, 2001, 19 (12): 1117 - 1118

20 Moshiri A, Close J, Reh TA. Retinal stem cells and regeneration [J]. Int J Dev Biol, 2004, 48 (8 - 9): 1003 - 1014

21 Nickerson PE, Emsley JG, Myers T, et al. Proliferation and expression of progenitor and mature retinal phenotypes in the adult mammalian ciliary body after retinal ganglion cell injury [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2007, 48 (11): 5266 - 5275

22 Das AV, Mallya KB, Zhao X, et al. Neural stem cell properties of Müller glia in the mammalian retina: regulation by Notch and Wnt signaling [J]. Dev Biol, 2006, 299 (1): 283 - 302

23 Bull ND, Limb GA, Martin KR. Human Müller stem cell transplantation in a rat model of glaucoma: survival, differentiation, and integration [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2008, 49 (8): 3449 - 3456

24 Tabar V, Tomishima M, Panagiotakos C, et al. Therapeutic cloning in individual parkinsonian mice [J]. Nat Med, 2008, 14 (4): 379 - 381

25 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

26 West EL, Pearson RA, Ischnutter 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

27 Levenberg S, Burdick JA, Kraehenbuehl T, et al. Neurotrophin-induced differentiation of human embryonic stem cells on three-dimensional polymeric scaffolds [J]. Tissue Engineering, 2005, 11 (3 - 4): 506 - 512

28 Stupp T, Pavlidis M, Busse H, et al. Lens epithelium supports axonal regeneration of retinal ganglion cells in a culture model in vitro [J]. Exp Eye Res, 2005, 81 (5): 530 - 538

29 Park KK, Liu K, Hu Y, et al. Promoting axon regeneration in the adult CNS by modulation of the PTEN/mTOR pathway [J]. Science, 2008, 322 (5903): 963 - 966

30 Xu C, Police S, Rao N, et al. Characterization and enrichment of cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells [J]. Circ Res, 2002, 91 (6): 501 - 508

31 Levin LA, Ritch R, Richards JE, et al. Stem cell therapy for ocular disorders [J]. Arch Ophthalmol, 2004, 122 (4): 621 - 627

32 Sanders EJ, Parker E, Aramburo C, et al. Retinal growth hormone is an anti-apoptotic factor in embryonic retinal ganglion cell differentiation [J]. Exp Eye Res, 2005, 81 (5): 551 - 560

(收稿: 2009-06-12 修回: 2009-09-10)

(本文编辑: 尹卫靖)

· 技术方法 ·

Photoshop 在处理荧光素眼底血管造影图中的应用

石珂 汪昌运

随着科学技术的不断进步,将现代科技与医学相结合的医学影像学技术得以迅猛发展,其中荧光素眼底血管造影(fundus fluorescein angiography, FFA)将眼底病的诊断水平又提高到了新的台阶。但目前市场上造影仪的单幅图像只能提供大约反映眼底 8 mm × 8 mm 的范围,单个图像在整体性上的不足在进行基础教学和学术交流中尤为明显,需要将多张图像拼接成一幅图以便全面完整地观察病变。20 世纪眼科学者多采用将 FFA 的照片冲洗出来后手工剪切、拼合层叠再拍摄,此方法成本高,同时费时费力。进入新世纪后数码照相技术飞速发展,使省时、省力、高效地处理 FFA 图像成为现实。目前已有国外生物工程公司开发了专用软件,但在国内尚未广泛应用,因此自己动手拼接 FFA 图像便成为现代眼科医师应具备的一项技能。

由 Adobe 公司开发设计的 Photoshop 软件是世界一流的专业图像处理软件,其操作界面如图 1。本研究应用 Photoshop CS2 9.0 版本^[1]来叙述如何进行图像的拼接,以期与同行们共同探讨交流。

1 基本步骤

1.1 目前市面上 FFA 仪可提供的图像有 2 种(图 2)。对于 TOPCON 造影图,每张图都需要先制作选区将中心的造影图提取出来。

1.1.1 在菜单栏中单击“图像”→“图像大小”(或按 Alt + Ctrl

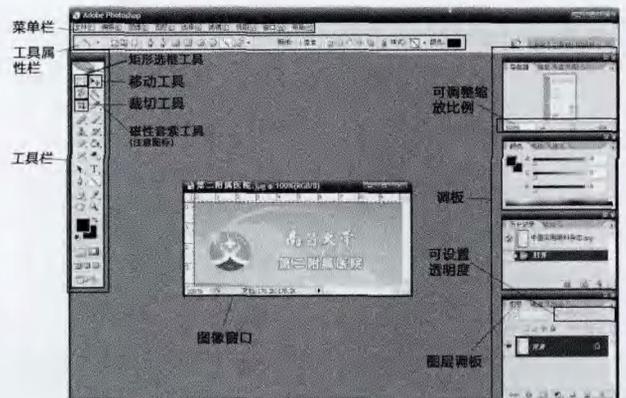


图 1 Photoshop CS2 9.0 操作界面

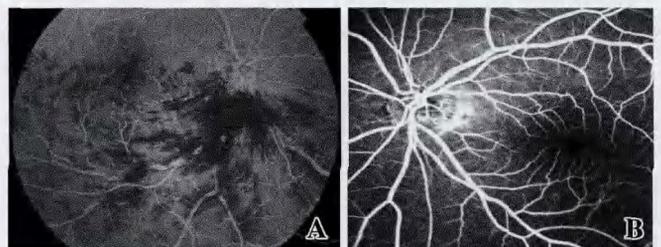


图 2 A:日本 TOPCON 株式会社 FFA 图像 B:德国 HEIDELBERG 公司 FFA 图像

作者单位:330006 南昌大学第二附属医院眼科(石珂,在读硕士研究生)

通讯作者:汪昌运 (Email: doctorwangcy@gmail.com)

+I 组合键),记下该图像的文档信息(本例图为宽度 18.03 cm、长度 13.53 cm、分辨率 150 像素/英寸)。