

利用内源性干细胞原位再生晶状体治疗 婴幼儿白内障

刘奕志

中山大学中山眼科中心, 广州 510060

摘要 利用内源性干细胞进行组织器官的修复和再生是再生医学研究的最终目标。婴幼儿白内障是幼儿致盲性眼病的首要病因, 目前尚无有效治疗手段。本研究组从哺乳动物内成功分离并获得了晶状体上皮干细胞, 证明 Pax6 和 Bmi1 是维持其分化和自我更新的关键因子, 并以保留内源性干细胞为目标, 设计了全新的白内障术式。相较于传统术式, 新术式最大程度地保留了内源性干细胞、基底膜和微环境, 在新西兰兔、食蟹猴和先天性白内障患儿内实现了功能性晶状体的再生。研究结果为白内障提供了全新的治疗策略并为组织再生及内源性干细胞的应用提供了全新的范例。

关键词 内源性干细胞; 晶状体再生; 婴幼儿白内障

双眼是人们认知世界最重要的器官, 然而却有许多人因先天性眼疾在黑暗中成长甚至度过余生。白内障是全球首位致盲眼病^[1]。正常情况下, 人晶状体是透明的, 而白内障患者的晶状体则一片混浊, 光线无法进入并聚焦到眼底视网膜进行成像。目前, 通过手术吸除混浊晶状体, 并植入人工晶体是唯一有效的白内障治疗手段, 但婴幼儿患者处于视功能发育期, 并不适合这种植入方法, 即便植入, 术后也可能经历重症炎症和并发症, 甚至可能导致不可逆性眼盲^[2-5]。

在这种情况下, 人们将治疗婴幼儿白内障的方法寄希望于天生具有再生修复潜能的干细胞。干细胞主要包括人胚胎干细胞(embryonic stem cell, ESCs, 简称ES细胞)、诱导多能性干细胞(induced pluripotent stem cells, 简称iPS细胞)以及各种成体干细胞, 是具有自我更新和多向分化潜能的细胞群体, 能分化为多种类型的细胞, 参与损伤组织的再生修复, 为治疗人体各种重

大疾病提供了新途径, 其应用价值已引起各国政府和科学界的高度重视。基于干细胞的治疗策略主要包括两类: 一是利用外源性干细胞体外扩增、分化并移植入受损的组织, 以达到组织修复的作用; 二是通过激活内源性干细胞达到组织原位再生的目的。

近年来, 外源性干细胞移植研究取得了显著进展。美国和英国已批准并开展人ES细胞来源的细胞治疗Stargardt病和老年黄斑变性的1期(早期)临床研究, 但目前仅有数例临床观察, ES细胞来源细胞移植的安全性和疗效尚不明确。人ES细胞由于伦理限制、免疫排斥以及致瘤风险等问题制约了其临床应用^[6-7]。iPS细胞在一定程度上避免了ES细胞面临的伦理争议, 但在体外扩增过程中存在基因组变异和化学诱导物效率低的难题, 而且基因操作可能带来不可预知的生物灾难, 其应用前景不明^[8-12]。最后, 移植后的干细胞即使能存活, 也存在与宿主组织整合及功能连接的困难, 使其

收稿日期: 2018-02-15; 修回日期: 2018-03-23

基金项目: 国家重大科技计划(973计划)项目(2015CB964600); 国家自然科学基金国际(地区)合作与交流项目(81320108008)

作者简介: 刘奕志, 教授, 研究方向为眼组织再生和重大致盲眼病防治, 电子信箱: yzliu62@yahoo.com

引用格式: 刘奕志. 利用内源性干细胞原位再生晶状体治疗婴幼儿白内障[J]. 科技导报, 2018, 36(7): 37-42; doi: 10.3981/j.issn.1000-7857.2018.07.006

临床转化受限^[13]。

由于外源性细胞移植治疗存在许多尚未逾越的障碍,我们开始关注人体组织中普遍存在的内源性成体干细胞^[14],哺乳动物眼组织中广泛存在着慢细胞周期的内源性干细胞,在生理病理状态下受刺激后能分化为不断扩增的短暂分裂细胞、有丝分裂后细胞及终末分化细胞,替代缺损组织^[15-16]。由于成体干细胞所蕴含的重大科学问题和应用价值,近来《Science》《Nature》和《Cell》等出版相关专辑和论文报道^[17-21],2009年《Science》策划出版“Steps to the Clinic”专题,强调成体干细胞的临床应用前景^[18]。若能证实并充分利用内源性成体干细胞的再生修复潜能,将有望实现组织原位再生。这种再生治疗策略的优势在于成体干细胞来源于自身,可以直接定向分化为功能细胞进行组织修复^[22],避免了伦理争议、免疫排斥等问题^[23]。

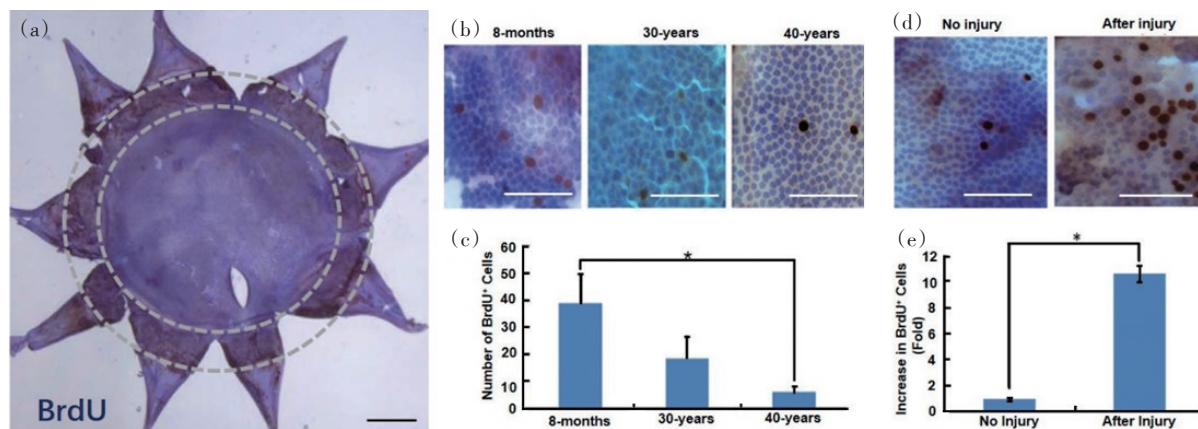
为了回答这个问题并找到实用方法,中山大学中山眼科中心刘奕志研究组(以下简称本研究组)从细胞、动物及患者多个层面,探索内源性干细胞在治疗婴

幼儿白内障的作用机理,并进一步促进其临床应用。该研究成果于2016年3月发表于《Nature》。

1 内源性晶状体上皮干细胞的鉴定

自我更新和定向分化是干细胞的两大基本特性。晶状体由上皮细胞、纤维细胞及包裹细胞的囊膜组成;上皮细胞分布在前囊膜下方。在成熟晶状体内,周边部上皮细胞可终生不断增殖并分化形成晶状体纤维细胞,以维持晶状体正常的生理功能^[24]。

为了证明晶状体周边部细胞的干细胞特性,首先通过5-溴脱氧尿嘧啶核苷(5-Bromo-2-deoxyUridine, BrdU)对不同年龄段的人尸体眼晶状体进行了标记(图1)^[25]。图1(a)~(c)所示,发现晶状体周边部增殖的细胞数量随着年龄增加而减少。此外,手术刺激后,图1(d)和图1(e)所示,增殖细胞数量显著上升,提示人晶状体周边部存在具有自我更新能力的干细胞,经手术刺激后具有强大的修复能力。



(a)晶状体囊膜铺片:BrdU 标记增殖的上皮细胞;(b)(c)随着年龄增加,BrdU 阳性细胞减少;(d)(e)损伤刺激后,BrdU 阳性细胞显著上升

图1 人晶状体周边部存在具有自我更新能力的上皮细胞

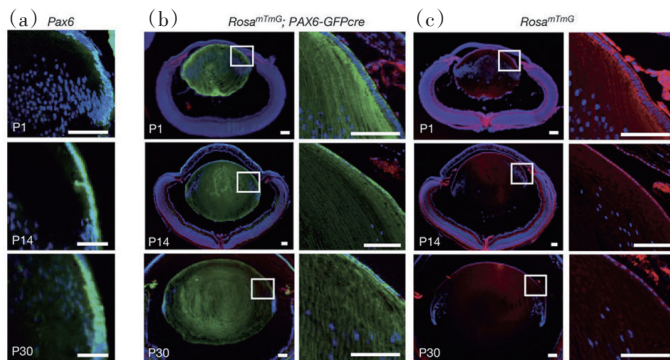
Fig. 1 LECs with self-renewal capacities in the lens germinative zone

此外,对细胞的分化能力进行了鉴定(图2)^[25]。Pax6 基因是眼发育的关键转录因子,在胚胎期晶状体形成过程中发挥重要的调控作用。出生后 1 d、14 d 和 30 d,在晶状体上皮内,尤其在周边部,Pax6 基因表达量依然很高(图2(a))。为了证明 Pax6 基因阳性的上皮细胞是否为分化形成晶状体纤维细胞的来源,在小鼠内进行了谱系示踪(将 Pax6^{PO-3.9-GFPcre} 小鼠和 ROSA^{mTmG} 小鼠杂交),发现 ROSA^{mTmG}、Pax6^{PO-3.9-GFPcre}

小鼠晶状体纤维细胞均为 GFP 阳性(图2(b)、(c))。结果表明,晶状体纤维细胞由 Pax6 阳性的晶状体上皮细胞分化而来。

为进一步探讨该细胞在维持晶状体功能中的作用,刘奕志研究团队以 PcG (Polycomb-group, 一类表观遗传调控因子) 家族中的 Bmi1 为研究对象进行了后续研究。Bmi1 是维持组织干细胞自我更新能力的重要因子^[26-28]。发现 Bmi1 在小鼠晶状体周边部和体外增殖

活跃的人 LECs 内均有表达。在 Bmi1 缺失的小鼠内, LECs 增殖能力下降, 数量减少, 最终导致晶状体发育异常, 形成白内障(图 3)^[25]。



(a)小鼠出生后 1 d、14 d 和 30 d, 晶状体上皮内, 尤其周边部, Pax6 的表达量依然很高; (b)(c) ROSA^{tmTmG}; PAX6^{P0-3.9-GFPcre} 小鼠出生后 1 d、14 d 和 30 d 的晶状体纤维细胞的细胞膜均为 GFP 阳性

图 2 晶状体纤维细胞由 Pax6+LECs 分化而来

Fig. 2 Pax6+LECs can contribute to the post-natal differentiation of lens fibre cells

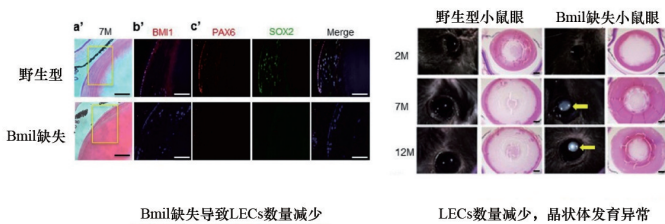


图 3 Bmi1 是维持 LECs 自我更新能力的重要因子

Fig. 3 Bmi1 maintains the self-renewal capacity of LECs

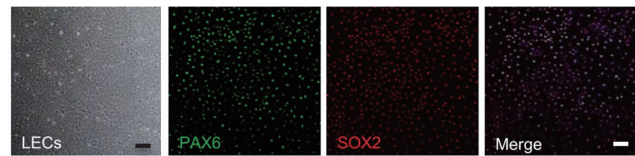
通过上述研究, 发现晶状体上皮层存在具有自我更新和分化能力的干细胞, 即晶状体上皮干细胞(Lens epithelial stem cells, LECs), 且 Bmi1 和 Pax6 分别为维持其自我更新能力和分化能力的关键因子。

2 体外模拟晶状体发育微环境, 晶状体上皮干细胞能形成透明类晶状体

本研究组对 LECs 能否分化形成晶状体进行了探讨。胚胎发育期, 晶状体前囊下 LECs 处于低浓度 FGF2 环境中, 维持其增殖状态; 而赤道部后的 LECs 处于高浓度 FGF2 环境中, 维持其分化能力^[29]。此外, 白内障术后 TGF-β2 分泌量升高, 可导致 LECs 上皮间质化(epithelial mesenchymal transition, EMT), 引起组织混浊。通过模拟晶状体发育的微环境, 利用低浓度 FGF2 和 TGF-β2 通路抑制剂, 建立了 LECs 增殖的体外培养体

系。利用高浓度 FGF2 以及 LECs 分化所需相关因子, 建立了晶状体纤维细胞的体外诱导体系, 促使 LECs 分化并形成透明的、凸起的、具有明显折光率的类晶状体; 提示可在体内诱导内源性 LECs 再生晶状体(图 4)^[25]。

体外培养晶状体上皮干细胞



形成类晶状体



图 4 体外培养的 LECs 在适宜的诱导条件下能够形成透明的、凸起的、具有明显折光率的类晶状体

Fig. 4 Upon differentiation, LECs formed transparent three-dimensional convex lens-like structures, defined as lentoid bodies, which possess significant refractive power

3 建立内微创术式, 诱导晶状体原位再生

如果能够充分利用晶状体内源性干细胞的再生潜能, 原位再生晶状体, 恢复其透光和聚光功能, 这将是现代白内障治疗, 特别是小儿白内障治疗手段的一项革命性尝试。早在 20 世纪 60 年代, 研究人员发现去除新西兰兔的晶状体内容物, 能观察到部分晶状体纤维的无序再生^[30-31], 但是结构紊乱, 视轴区混浊。在临床上, 白内障术后常常会复发, 其原因是残余的周边晶状体细胞增殖, 在中央产生混浊的结构遮挡光线, 即被称为后发性白内障(以下简称后发障)的并发症; 在后发障中, 我们观察到晶状体周边部可形成部分透明类晶状体结构, 一种不同程度无序生长的“甜甜圈”状的再生晶状体组织(图 5)。

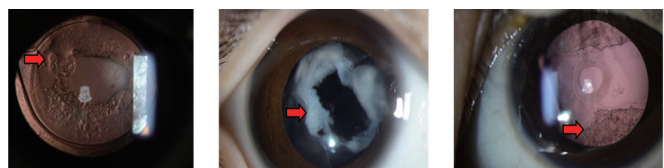


图 5 现行术式术后: 异常再生, 形成无序的“甜甜圈”样晶状体组织

Fig. 5 Abnormal regeneration with "doughnut-like" lens structure after treatment using the current surgical method

那么,能否将过去认为的并发症转变为一种突破性的新疗法?让内源性干细胞在体内长出透明的、结构完整和功能正常的晶状体?

本研究组发现目前的白内障手术中,需要在晶状体前囊膜打开一个直径为6 mm的撕囊口,造成大量上皮细胞丢失,破坏了晶状体再生所需的完整囊袋,并会引起严重的炎症反应,无法有效修复晶状体的透光和折光功能。为了解决这些问题,刘奕志首创了内微创白内障术式,建立了一种新的环形撕囊术,该术式具有以下特点:(1)撕囊口显著缩小(直径仅1~1.5 mm)并快速愈合,使LECs不受炎症因子等干扰,保护了再生所需的微环境;(2)撕囊口从视轴中央转移至周边,提高了视轴透明度;(3)清除病变组织的同时,最大程度地保留了内源性上皮干细胞,并保护了细胞分化和组织再生所需的囊膜支架(图6)。

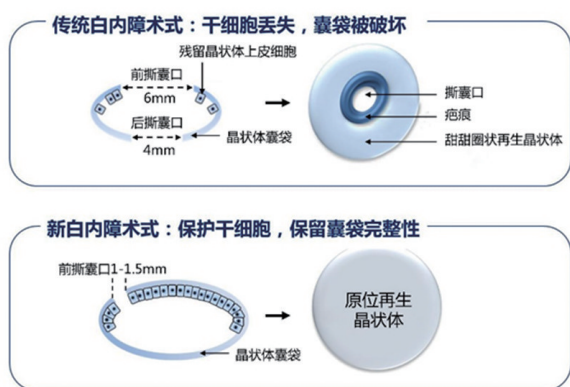


图6 传统白内障手术和新内微创术式比较

Fig. 6 Current capsulorhexis method in cataract surgery vs new capsulorhexis method

本研究组首先在新西兰兔验证了晶状体的原位再生能力。通过内微创撕囊术,保留了内源性LECs和完整内环境。术后通过裂隙灯和眼底镜观察、BrdU标记以及组织学分析等技术,对再生晶状体功能、形态和LECs的生物学行为进行了示踪和观察。组织学分析显示,晶状体再生过程与其发育过程类似。术后LECs活跃增殖并逐渐分化形成LFCs,最终形成透明双凸状晶状体(术后7周)(图7^[25])。

随后,采用该术式在1~3月龄食蟹猴内(相当于4~12个月龄的婴儿)开展了晶状体再生实验。术后5个月,观察到透明双凸状晶状体形成(黄色箭头),视轴和眼底结构清晰(图8^[25])。

最后,对2岁以下白内障患儿开展了临床试验,观察内微创手术能否实现人晶状体的再生。12名小儿白

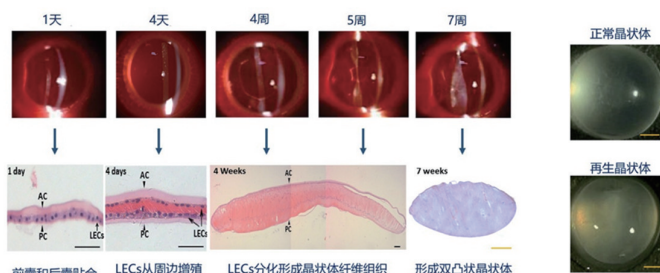


图7 新西兰兔眼内行内微创术式,术后形成透明的、双凸状再生晶状体

Fig. 7 Lens regeneration with a double-convex shape in New Zealand white rabbits using new minimally invasive surgical method

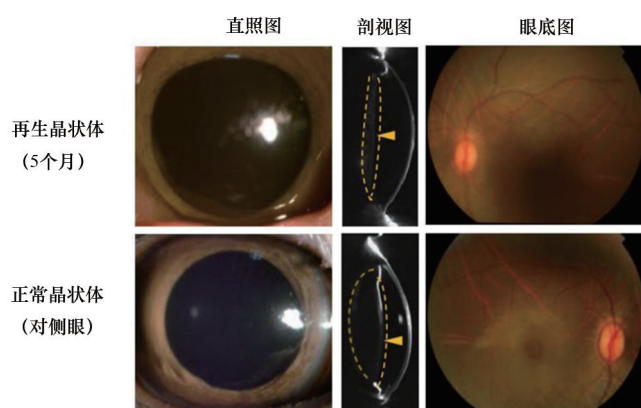


图8 在1~3月龄食蟹猴内开展晶状体再生实验:术后5个月,观察到透明双凸状晶状体形成视轴和眼底结构清晰

Fig. 8 Lens regeneration in macaques in 1~3 months of age using new minimally invasive surgical method: Pentacam cross-sectional scanning showed formation of a biconvex structure 5 months after surgery. Direct illumination and fundus photography showed that the visual axis remained transparent and the retina was clearly visible

内障患者行内微创手术以获得晶状体再生,对照组25名白内障患儿行目前标准手术。通过裂隙灯显微镜等动态观察并记录术后晶状体再生情况。术后8个月,再生晶状体的平均中央厚度显著增加,与正常晶状体相当,屈光力显著增加,视功能提高(图9)。

4 结论

本研究组首次利用新的再生术式原位再生出功能性晶状体,且后发障的发生率大幅降低。到目前为止,已有100多名不宜植入人工晶状体的2岁以下患白内障的婴幼儿受益,为许多有同样遭遇的家庭带来了希望。现在正在开展临床试验评估长期疗效,使这种新

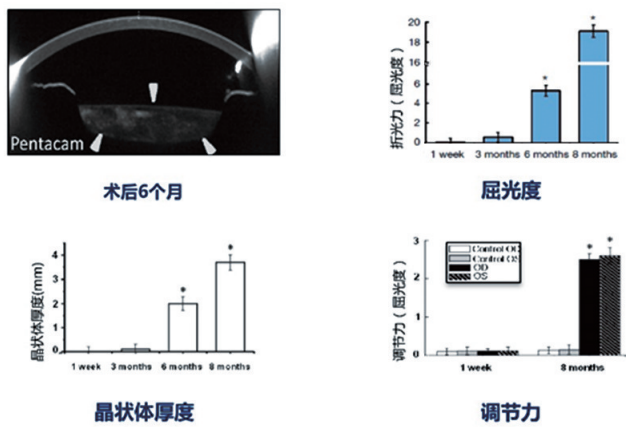


图9 婴幼儿白内障内微创手术后,再生晶状体中央厚度增加,屈光度显著增加,视功能提高

Fig. 9 Increase of central thickness of regenerated lens and the refractive power, as well as visual repair in pediatric cataract patients after the novel minimally invasive surgery

术式成为治疗此类疾病的标准和常规方案。

从更长远的角度看,内源性干细胞的应用也将在更广阔的领域发挥作用,通过动员内源性成体干细胞,促进机体再生修复潜能,还有望用于治疗角膜等眼组织病变,甚至血管、肝脏等其他组织器官,这将是干细胞临床应用的新方向,探索研究其机理和疗法也是医学科学的新领域。

参考文献 (References)

- [1] Stevens G A, White R A, Flaxman S R, et al. Global prevalence of vision impairment and blindness: Magnitude and temporal trends, 1990—2010[J]. *Ophthalmology*, 2013, 120(12): 2377–2384.
- [2] Visser N, Bauer N J, Nuijts R M. Toric intraocular lenses: Historical overview, patient selection, IOL calculation, surgical techniques, clinical outcomes, and complications[J]. *Journal of Cataract & Refract Surgery*, 2013, 39(4): 624–637.
- [3] Mamalis N, Davis B, Nilson C D, et al. Complications of foldable intraocular lenses requiring explantation or secondary intervention: 2003 survey update[J]. *Journal of Cataract & Refract Surgery*, 2004, 30(10): 2209–2218.
- [4] Bothun E D, Cleveland J, Lynn M J, et al. One-year strabismus outcomes in the Infant Aphakia Treatment Study[J]. *Ophthalmology*, 2013, 120(6): 1227–1231.
- [5] Infant Aphakia Treatment Study Group, Lambert S R, Buckley E G, et al. A randomized clinical trial comparing contact lens with intraocular lens correction of monocular aphakia during infancy: Grating acuity and adverse events at age 1 year[J]. *Archives of Ophthalmology*, 2010, 128(7): 810–818.
- [6] Barde Y. Caution urged in trial of stem cells to treat spinal-cord injury[J]. *Nature*, 2009, 458(7234): 29.
- [7] Zarzeczny A, Caulfield T. Emerging ethical, legal and social issues associated with stem cell research & and the current role of the moral status of the embryo[J]. *Stem Cell Reviews and Reports*, 2009, 5(2): 96–101.
- [8] Ohnishi K, Semi K, Yamamoto T, et al. Premature termination of reprogramming *in vivo* leads to cancer development through altered epigenetic regulation[J]. *Cell*, 2014, 156(4): 663–677.
- [9] Gore A, Li Z, Fung H L, et al. Somatic coding mutations in human induced pluripotent stem cells[J]. *Nature*, 2011, 471(7336): 63–67.
- [10] Lister R, Pelizzola M, Kida Y S, et al. Hotspots of aberrant epigenomic reprogramming in human induced pluripotent stem cells[J]. *Nature*, 2011, 471(7336): 68–73.
- [11] Kim K, Doi A, Wen B, et al. Epigenetic memory in induced pluripotent stem cells[J]. *Nature*, 2010, 467(7313): 285–290.
- [12] Hyun I, Hochedlinger K, Jaenisch R, et al. New advances in iPS cell research do not obviate the need for human embryonic stem cells[J]. *Cell Stem Cell*, 2007, 1(4): 367–368.
- [13] Shimazaki J, Shimmura S, Tsubota K. Donor source affects the outcome of ocular surface reconstruction in chemical or thermal burns of the cornea[J]. *Ophthalmology*, 2004, 111(1): 38–44.
- [14] Moore K A, Lemischka I R. Stem cells and their niches[J]. *Science*, 2006, 311(5769): 1880–1885.
- [15] Blanpain C, Lowry W E, Geoghegan A, et al. Self-renewal, multipotency, and the existence of two cell populations within an epithelial stem cell niche[J]. *Cell*, 2004, 118(5): 635–648.
- [16] Kalluri R, Weinberg R A. The basics of epithelial-mesenchymal transition[J]. *The Journal of Clinical Investigation*, 2009, 119(6): 1420–1428.
- [17] Fuchs E, Tumber T, Guasch G. Socializing with the neighbors: Stem cells and their niche[J]. *Cell*, 2004, 116(6): 769–778.
- [18] Purnell B A, Hines P J. Steps to the clinic[J]. *Science*, 2009, 324(5935): 1661.
- [19] Blanpain C, Horsley V, Fuchs E. Epithelial stem cells: Turning over new leaves[J]. *Cell*, 2007, 128(3): 445–458.
- [20] Miller F D, Kaplan D R. Mobilizing endogenous stem cells for repair and regeneration: Are we there yet[J]. *Cell Stem Cell*, 2012, 10(6): 650–652.
- [21] Sato T, Van Es J H, Snippert H J, et al. Paneth cells constitute the niche for Lgr5 stem cells in intestinal crypts[J]. *Nature*, 2011, 469(7330): 415–418.
- [22] Sanberg P R, Eve D J, Metcalf C, et al. Advantages and chal-

- lenges of alternative sources of adult-derived stem cells for brain repair in stroke[J]. *Progress in Brain Research*, 2012, 201: 99–117.
- [23] Huang S X, Islam M N, O'Neill J, et al. Efficient generation of lung and airway epithelial cells from human pluripotent stem cells[J]. *Nature Biotechnology*, 2014, 32(1): 84–91.
- [24] Beebe D C, Holekamp N M, Shui Y B. Oxidative damage and the prevention of age-related cataracts[J]. *Ophthalmic Research*, 2010, 44(3): 155–165.
- [25] Lin H T, Ouyang H, Zhu Jie, et al. Lens regeneration using endogenous stem cells with gain of visual function[J]. *Nature*, 2016, 531(7594): 323–328
- [26] Park I K, Qian D, Kiel M, et al. Bmi-1 is required for maintenance of adult self-renewing haematopoietic stem cells[J]. *Nature*, 2003, 423(6937): 302–305.
- [27] Lessard J, Sauvageau G. Bmi-1 determines the proliferative capacity of normal and leukaemic stem cells[J]. *Nature*, 2003, 423(6937): 255–260.
- [28] Molofsky A V, Pardal R, Iwashita T, et al. Bmi-1 dependence distinguishes neural stem cell self-renewal from progenitor proliferation[J]. *Nature*, 2003, 425(6961): 962–967.
- [29] Sugiyama Y, Lovicu F J, McAvoy J W. Planar cell polarity in the mammalian eye lens[J]. *Organogenesis*, 2011, 7(3): 191–201.
- [30] Gwon A. Lens regeneration in mammals: A review[J]. *Survey of Ophthalmology*, 2006, 51(1): 51–62.
- [31] Gwon A E, Gruber L J, Mundwiler K E. A histologic study of lens regeneration in aphakic rabbits[J]. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 1990, 31(3): 540–547.

Pediatric cataract therapy with endogenous stem cells-mediated lens regeneration

LIU Yizhi

Zhongshan Ophthalmic Center, Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510060, China

Abstract Repair and regeneration of tissues using endogenous stem cells represent an ultimate goal in regenerative medicine. To our knowledge, human lens regeneration has not yet been demonstrated. Currently, the only treatment for cataracts, the leading cause of blindness worldwide, is to extract the cataractous lens and implant an artificial intraocular lens. However, this procedure may pose notable risks of complications. In this paper we isolate lens epithelial stem/progenitor cells (LECs) in mammals and show that Pax6 and Bmi1 are required for LEC renewal. We design a surgical method for removal of cataract that preserves endogenous LECs and achieves functional regeneration of lens in rabbits and macaques, as well as in human infants with cataracts. Our method differs conceptually from the current practice, preserves endogenous LECs and their natural environment maximally, and regenerates lenses with visual function. Our approach demonstrates a novel treatment strategy for cataracts and provides a new paradigm for tissue regeneration using endogenous stem cells.

Keywords endogenous stem cells; lens regeneration; pediatric cataract ●



(责任编辑 卫夏雯)