

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2017.14.049

小分子化合物诱导干细胞向视网膜感光细胞分化的研究进展*

陈红 彭广华[△]

(解放军总医院 眼科 北京 100853)

摘要:干细胞是一类具有多向分化潜能的细胞群,如胚胎干细胞(embryonic stem cell,ESC)、诱导多潜能干细胞(induced pluripotent stem cell,iPSC)等,可在特定的条件下向包括视网膜感光细胞在内的多种细胞分化。小分子化合物是一类由组织细胞合成、分泌的小分子多肽类因子,特定的小分子化合物可作用于干细胞诱导其向视网膜感光细胞分化。目前,对干细胞体外培养,通过使用不同的诱导培养方案,探索干细胞向视网膜感光细胞分化的研究成为热点。早期,研究者们主要在共培养条件下采用小分子化合物诱导 ESC 向视网膜感光细胞分化,随着研究的进展,逐渐开始探索在无共培养条件下小分子化合物诱导 ESC 向视网膜感光细胞的分化以及小分子化合物诱导 iPSC 向视网膜感光细胞的分化。本文主要就小分子化合物促进 ESC 和 iPSC 向视网膜感光细胞分化的研究进展进行综述。

关键词:感光细胞;干细胞;小分子化合物;视网膜;胚胎干细胞;诱导多潜能干细胞

中图分类号:R774.1+3; Q254 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2017)14-2797-04

Research Progress of the Differentiation of Stem Cells into Retinal Photoreceptor Cells induced by Small Molecular Compounds*

CHEN Hong, PENG Guang-hua[△]

(Department of Ophthalmology, General Hospital of Chinese PLA, Beijing, 100853, China)

ABSTRACT: Stem cells are pluripotent cells with capacity self-replication, such as embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells, which can differentiate into a variety of cell types including retinal photoreceptor cells under certain conditions. Small molecule compounds are a kind of small molecule polypeptide, which is synthesized and secreted by the tissue cells and act on stem cells to induce their differentiation into retinal photoreceptor. Stem cells are cultured in vitro, and the study of the differentiation of stem cells into retinal photoreceptor cells has become a hot spot by using different induction culture programs. In order to provide the help for the further study of the differentiation of stem cells into the photoreceptor cells of retina and the clinical treatment of retinal degeneration diseases. In the early stage, researchers mainly used small molecule compounds to induce ESC to differentiate into photoreceptor cells under co culture conditions. With the development of the research, it has been gradually explored that small molecule compounds induce ESC to differentiate into photoreceptor cells in the absence of co culture and the differentiation of iPSC into photoreceptor cells induced by small molecules. In this paper, the research status of small molecular compounds promoting embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells to differentiate into retinal photoreceptor cells were reviewed.

Key words: Photoreceptor; Stem cells; Small molecule compounds; Retina; Embryonic stem cells; Induced pluripotent stem cells

Chinese Library Classification(CLC): R774.1+3; Q254 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2017)14-2797-04

前言

视网膜变性疾病是引起失明的一个主要原因,包括黄斑变性疾病、视网膜色素变性疾病等。WHO 近期的一项流行病学调查显示美国 55 岁以上的人群中已有近八百万年龄相关性黄斑变性患者,且 50 岁以上的人群发病率达 3.5/1000,世界范围内 75 岁以上的人群中有近 1/3 患有年龄相关性黄斑变性^[1-3]。此类疾病可引起视网膜感光细胞进行性和不可逆性损伤,分化成熟的视网膜感光细胞死亡后不能再生,目前国内外尚无有效的治疗方法。1998 年,James Thomson 团队首次提取到人类胚胎干

细胞(human embryonic stem cell,hESC)并建立了人胚胎干细胞系^[4],近期 Damdimopoulou 等人也建立了人胚胎干细胞系,与前者相比,后者人胚胎干细胞系的获得来自单一的胚胎活检细胞,不需要破坏胚胎^[5]。2006 年,Yamanaka 团队首次采用导入转录因子的方式成功将小鼠的成纤维细胞诱导分化为 iPSC^[6]。随后研究者们开始探索小分子化合物诱导干细胞向视网膜感光细胞的分化,目前大多数诱导方案中常用的小分子化合物主要包括 Dkk-1、LeftyA、IGF-1、bFGF、aFGF、Activin-A、RA、taurine 等^[7,8]。干细胞和 iPSC 来源的视网膜祖细胞(retinal progenitor cell,RPC)、Nrl+ 视杆前体细胞等,通过视网膜下腔注射,移

* 基金项目:国家 973 重点基础研究发展规划项目(2013CB967001);国家自然科学基金项目(31271400)

作者简介:陈红(1988-),硕士研究生,研究方向:儿童眼病,电话:18311426245, E-mail: syjh102990@sohu.com

△ 通讯作者:彭广华,博士研究生导师,教授,研究方向:儿童眼病基础与临床研究,视网膜感光细胞发育, E-mail: peng63088@163.com

(收稿日期:2016-12-14 接受日期:2017-01-12)

植细胞能成功整合到宿主小鼠视网膜内,并表达感光细胞特异性蛋白,恢复宿主小鼠的部分视力^[9-15]。大量研究表明以 ESC、iPSC 等为主要来源的感光细胞的替代性移植治疗将成为治疗视网膜变性疾病的一种具有广阔前景的治疗策略。

1 参与视网膜感光细胞分化过程的小分子化合物

1.1 小分子化合物概述

小分子化合物或细胞因子多为组织细胞合成、分泌的小分子多肽类因子,可诱导细胞分化,参与细胞生理功能的调节,减少细胞凋亡,参与细胞间信号的转导,提高神经细胞存活率,某些小分子化合物在诱导干细胞向视网膜感光细胞分化方面发挥着重要作用。已有研究证明小分子化合物可作为细胞外刺激信号通过相应通路或受体调控分化过程中的基因转录水平,影响细胞分化的命运。感光细胞的分化调控过程非常复杂,参与诱导的小分子化合物在空间、时序、剂量等各个方面需要达到有效的最佳组合^[16,17,2]。参与促进干细胞向视网膜感光细胞分化的小分子化合物主要包括 DAPT、shh、RA、taurine、Y-27632、Dkk-1、LeftyA、Noggin、IGF-1、bFGF、aFGF、Activin-A 等。

1.2 主要的小分子化合物的作用机制

小分子化合物通过作用于细胞信号通路等发挥着重要作用。Dkk-1 (Dickkopf-1, Dkk-1) 是 Wnt 信号通路的抑制剂,为 Wnt 通路抑制剂 Dkk 家族中的一员,是一种糖蛋白,与神经的分化、细胞的凋亡密切相关,在神经系统的发育中发挥着重要作用^[18,19],能促进神经祖细胞向终末细胞分化,在无血清、无 feeder 的培养体系中加入 Dkk-1,可促进 hESC 产生 Rx+ 视网膜前体细胞^[20,21]。Activin-A 是转化生长因子 β 超家族中的一员^[22],作为一种多功能调控蛋白在多种组织和器官中发挥着重要作用。在神经系统中,Activin-A 具有营养神经和保护神经等多种功能,破坏 Activin 信号通路将引起焦虑、抑郁、神经退行性疾病等疾病^[23]。近年来,研究者将 Activin-A 和其它外源性因子一起应用于体外培养,在促进干细胞向视网膜感光细胞分化的过程中发挥着重要作用。

视黄酸(retinoic acid, RA)是维生素 A 的代谢产物,可促进细胞的再生和分化。RA 信号通路与胚胎期、出生后早期神经细胞的分化密切相关,参与多种神经系统的发育过程。抑制 RA 信号通路将导致神经细胞变性。在体外培养条件下,RA 与其它因子相互作用,可诱导干细胞分化为外胚层,在诱导感光细胞形成及促进感光细胞成熟过程中发挥着重要作用^[24]。Noggin 是 BMP 通路的抑制剂,在促进干细胞向 RPC 分化的过程中起着一定的调控作用。SMAD 信号的两种抑制剂 Noggin 和 SB431542 的协同作用可促使 ESC 向神经细胞快速、完整的分化^[25]。在缺乏 IGF-1 的情况下,Noggin 和 Dkk1 不能诱导 hESC 向视网膜感光细胞的分化^[26]。在下述的“三步法”培养方案里,缺乏其他外源性生长因子的条件下,加入 IGF-1 能够提高视杯样结构形成的效率,促进形成特定的感光体超微结构形态和辅助形成视网膜的分层和活力^[27]。

2 小分子化合物诱导胚胎干细胞向视网膜感光细胞的分化

2.1 共培养条件下小分子化合物促进胚胎干细胞向视网膜感

光细胞的分化

早期,研究者们采用虹膜、ESC 等组织获得视网膜感光细胞。由于 ESC 具有无限增殖的潜能,可提供足够移植数量的视网膜感光细胞,使得 ESC 逐渐成为研究的热点^[21]。2005 年, Ikeda^[28]等采用无血清悬浮培养法(SFEB 培养法)培养小鼠胚胎干细胞(mouse embryonic stem cell, mESC),在培养过程中加入 wnt 和 nodal 信号通路抑制剂 Dkk-1 和 LeftyA,培养的第 3 天和第 4 天分别加入血清和 Activin-A(SFEB /DLFA 法),最终可促使 mESC 产生 16%RX+ 的 RPC,在培养的第 5 天加入胚胎天数为 17.5 天的小鼠胚胎视网膜组织,并在 5%CO₂ 的环境中培养 12 天,研究结果显示 mESC 经诱导分化有 36%细胞表达感光细胞标记物 rhodopsin、ecoverin。hESC 来源的自体神经上皮细胞与细胞外基质共同培养,在 5 天内可快速分化成 RPC, RPC 在培养的第 10 天分化为 CRX+ 感光前体细胞,继续培养 4 周,即可获得视网膜视杆细胞^[16]。共培养条件下获得视网膜感光细胞是一种具有挑战性的培养方式,但共培养过程中会引起细胞污染等问题,这提示我们需要探求更优化的诱导方式促使 ESC 向视网膜感光细胞分化。

2.2 无共培养条件下小分子化合物促进胚胎干细胞向视网膜感光细胞的分化

近两年有研究报道小鼠和人 ESC 可通过特殊培养分化成一个三维视杯,类似于脊椎动物胚胎期的胚眼^[29]。由于共培养条件下存在细胞污染的问题,研究者正在无共培养条件下探索 ESC 向视网膜感光细胞分化,并且诱导方案不断被改进^[30-32]。2008 年,Osakada 等^[16,21]在无胚胎视网膜组织共培养条件下,将 hESC 诱导分化为视网膜感光细胞,培养中同样使用了 Wnt、Nodal 信号通路抑制剂 Dkk-1、LEFTY,在培养的第 170 天可见 20%的感光前体细胞,其中添加 RA、taurine 等物质可促使 rhodopsin+、opsin+ 的视网膜感光细胞成熟。研究结果表明经过 150-200 天的诱导分化,约 12-20%的 hESC 分化为视锥细胞和视杆细胞。Mellough 等^[30,27]在无血清悬浮培养(SFEB)系统中联合 Dkk1、LeftyA(DL),采用 SFEB/DL +RA/T(视黄酸+牛磺酸+N2 补充物)培养法诱导猴的 ESC 向视网膜感光细胞分化,成功获得视锥细胞。Lamba 等^[26]的研究指出 DKK-1、Noggin、IGF-1 的联合应用可加速 hESC 来源的拟胚体向感光前体细胞分化,培养三周后可产生 38.6%rhodopsin+ 的感光细胞,诱导分化中选用的拟胚体的大小和形状可影响 hESC 的分化^[26,33]。上述诱导方案中 ESC 无需与胚胎视网膜组织共培养,虽所需诱导时间长,但避免了共培养过程中存在的细胞污染问题。

2012 年, Mellough 等^[34]采用“三步法”诱导 hESC 向视网膜感光细胞分化。第一步,在含 MEF 细胞的人胚胎干细胞培养基上培养 hESC,加入胶原酶后获得人胚胎干细胞团形成拟胚体。第二步,将拟胚体在神经诱导培养基上培养 37 天,培养基中含有 Noggin、DKK-1、IGF-1、FGF、Lefty A、T3、RA、taurine、shh、Activin -A。第三步,在基因敲除的无血清培养基中继续培养,添加 IGF-1。该方案可促使 hESC 在特定阶段向神经组织和感光细胞系分化。“三步法”诱导方案表明 hESC 可在 45 天内分化产生 16%的 CRX+ 细胞和 52%的视锥细胞,且诱导效率较高,但所得细胞生存期较短。

上述 Osakada 等的诱导方案过程复杂、花费高,诱导效率较低、所需时间长。Boucherie 等^[16]进一步优化培养方案,首先使 hESC 在铺有 1% Matrigel 的六孔板上生长 1 小时,吸去培养液后用 2% Matrigel 覆盖细胞,2% Matrigel 由神经分化培养液(DMEM/F12+1%N₂+1%B27)稀释而成,孵箱中过夜后,使用神经分化培养液(DMEM/F12+1%N₂+1%B27)换液,两天后可观察到 hESC 聚集形成柱状神经上皮。在第 10 天添加小分子化合物 RA, taurine, bFGF, aFGF, shh, 诱导时间为 30 天。第 10 天可检测到 60%CRX⁺ 感光前体细胞,CRX 是视网膜感光细胞早期标志物,诱导四周后可发现 36%NRL⁺ 的视杆细胞。该方案所需诱导时间短、诱导过程简单,诱导分化效率较 Osakada 等的诱导方法提高约 16%。

2015 年,Zhou 等^[20]将重组的 COCO 作用于 hESC,成功获得了 S 视锥细胞。COCO 是一种多功能 BMP、TGF β 、Wnt 信号通路拮抗剂,在培养中添加 COCO、FGF2 后可发现 CRX 和 S-opsin 基因的表达,并且这种效应具有剂量依赖性,当 COCO 的浓度在 30 ng/mL 至 50 ng/mL 时,诱导活性最高。同时发现加入 10 ng/mL 的 IGF1 后,CRX 和 S-opsin 基因表达量提高。该研究还指出在诱导过程中添加甲状腺激素将影响 S 视锥细胞与 M 视锥细胞产生的比例,并且整个诱导过程不经过拟胚体步骤即可实现。此研究结果表明使用该方案可促使 60-80% hESC 在 4-5 周内分化成 S 视锥细胞,hESC 分化而来的视网膜前体细胞,需要暴露在 COCO、FGF2 和 IGF1 下才能继续分化成为 S 视锥细胞,研究结果也支持了感光细胞的分化是通过默认的 S-cone 通路这一猜想。

3 小分子化合物促进诱导多潜能干细胞向视网膜感光细胞的分化

利用分别携带 Sox2, Oct4, Myc, Klf4 转录因子的逆转录病毒载体感染小鼠的成纤维细胞,2006 年中仲弥等首次成功获得了多分化潜能的 iPSC^[6]。iPSC 与 ESC 生物学特性相似,可通过特定转录因子的表达使人体细胞回到多潜能状态^[35,36]。iPSC 与 ESC 在分化为体细胞方面没有显著差别,iPSC 可来自于患者自身细胞,极大降低了免疫排斥反应^[37,44],因此具有广阔的应用前景。

早期,Zhou 等^[38]在体外诱导分化猪来源 iPSC,最终成功获得了视网膜感光细胞,目的细胞在移植入病变的猪视网膜后可与宿主细胞融合,此项研究为 iPSC 来源的目的细胞治疗视网膜变性疾病提供了基础研究依据。Croze 等^[39,40]的研究表明 iPSC 在 Dkk-1、Lefty-A 等诱导下可向包括感光细胞在内的不同视网膜细胞分化。上述 Boucherie 等^[16]在探索高效、经济的 hESC 向视网膜感光细胞分化的同时,使用相同的诱导方法作用于 iPSC,同样在两天后观察到 iPSC 聚集形成柱状神经上皮,第 5 天可见 Rax⁺、Sox9⁺ 的 RPC,在诱导分化的第 10 天,CRX⁺ 感光前体细胞逐渐成熟,四周后可出现 Nrl⁺、Rhodopsin⁺ 视杆细胞。

2014 年,Zhong 等^[41]在含有 DMEM/F12、N₂、非必需氨基酸、肝素等的神经分化培养基中培养 hiPSC,8 天后可观察到表达 PAX6 和 SOX1 的早期神经上皮组织,随后在培养基中添加胎牛血清(FBS)、taurine、RA、B27。在培养的第 25 周可检测到

视杆细胞光传导信号。为促进感光细胞成熟,在不同时间窗,即第 7 至 17 周,第 7 周或第 10 至 14 周,每天添加 1 μ MRA,随后 RA 浓度降低至 0.5 μ M,若长时间使用高浓度 RA(1 μ M)将抑制感光细胞成熟^[42]。此项研究结果显示在培养的第 7 周可发现 OTX2⁺ 的感光细胞,感光细胞表达视杆视蛋白,在培养的第 21 周可见 90%hiPSC 来源的感光细胞表达视杆视蛋白,培养过程中未发现 L/M 或 S 视锥视蛋白的表达。2016 年 Reichman 等^[43]在无血清神经培养基中培养成人皮肤成纤维细胞来源的 hiPSC,首先将 hiPSC 在去除 FGF2 的诱导多潜能干细胞培养基中培养两天,随后转移至神经分化培养基中培养,神经分化培养基包含 DMEM/F12、MEM、N₂ 等,在培养的第 14 天加入 FGF2,第 21 天再次去除 FGF2,2 周后可见神经视网膜样结构,神经视网膜样结构中 CRX⁺ 细胞的出现表明 RPC 开始向视网膜感光细胞方向分化。在培养的第 21 至 35 天,可见大部分 RPC 向感光细胞方向分化,表现为对应的 CRX、NRL 两种感光细胞的特异性转录因子的表达。

随着研究的不断深入,iPSC 向视网膜感光细胞分化的策略不断改进。iPSC 因来源于患者自身细胞,避免了移植排斥的风险,但它同时也存在着安全隐患,主要表现为诱导过程中使用的转录因子和逆转录病毒可能导致致癌风险。同时 iPSC 替代性治疗应用于临床移植后还应考虑到目的细胞能否长期发挥作用。

4 小结

促进干细胞向视网膜感光细胞分化的小分子化合物首选重组蛋白,因其成本低,许多研究团队都采用重组蛋白建立和改进研究方案。除非与胚胎视网膜组织等共培养,否则感光前体细胞很少分化成感光细胞,但共培养条件下,诸如细胞污染问题将影响实验结果,因此小分子化合物在无胚胎视网膜组织共培养条件下,诱导 ESC 向视网膜感光细胞分化的研究具有广阔的前景和巨大的价值。ESC 可在体内分化成任何一种细胞或组织,给再生医学领域赋予新的生命,视网膜变性后,感光细胞移植有能力重建视功能。为判定感光细胞移植作为一种通用疗法治疗视网膜变性疾病的可行性,移植必须不同的模型上和视网膜变性的不同阶段进行。目前,关于 hESC 向视网膜感光细胞分化的三维培养研究逐渐成为热点,干细胞向视网膜感光细胞诱导分化的策略仍需我们进一步探索优化。

致谢

衷心感谢国家 973 重点基础研究发展规划项目(2013CB967001);国家自然科学基金项目(31271400)基金的支持。

参考文献(References)

- [1] Kashani Amir H. Stem Cell Therapy in Nonneovascular Age-Related Macular Degeneratio [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2016, 57(5): ORSfml-9
- [2] Jayakody SA, Gonzalez-Cordero A, Ali RR, et al. Cellular strategies for retinal repair by photoreceptor replacement [J]. Prog Retin Eye Res, 2015, 46: 31-66
- [3] Nazari H, Zhang L, Zhu D, et al. Stem cell based therapies for age-related macular degeneration: The promises and the challenges [J]. Prog Retin Eye Res, 2015, 48: 1-39

- [4] Thomson J A, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts [J]. Science, 1998, 282(5391): 1145-1147
- [5] Dandimopoulou P, Rodin S, Stenfelt S, et al. Human embryonic stem cells[J]. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol, 2016, 31: 2-12
- [6] 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
- [7] Tucker Budd A, Mullins Robert F, Streb Luan M, et al. Patient-specific iPSC-derived photoreceptor precursor cells as a means to investigate retinitis pigmentosa[J]. Elife, 2013, 2: e00824
- [8] Rira M, Fontrodona L, Albert S, et al. Comparative study of human embryonic stem cells (hESC) and human induced pluripotent stem cells (hiPSC) as a treatment for retinal dystrophies [J]. Mol Ther Methods Clin Dev, 2016, 3: 16010
- [9] Homma K, Okamoto S, Mandai M, et al. Developing rods transplanted into the degenerating retina of crx-knockout mice exhibit neural activity similar to native photoreceptors [J]. Stem Cells, 2013, 31(6): 1149-1159
- [10] Lamba DA, Gust J, Reh TA, et al. Transplantation of human embryonic stem cell-derived photoreceptors restores some visual function in Crx-deficient mice[J]. Cell Stem Cell, 2009, 4(1): 73-79
- [11] Pearson RA, Barber AC, Rizzi M, et al. Restoration of vision after transplantation of photoreceptors [J]. Nature, 2012, 485 (7396): 99-103
- [12] Postel K, Bellmann J, Splith V, et al. Analysis of cell surface markers specific for transplantable rod photoreceptors [J]. Mol Vis, 2013, 19: 2058-2067
- [13] Santos-Ferreira T, Postel K, Stutzki H, et al. Daylight vision repair by cell transplantation[J]. Stem Cells, 2015, 33(1): 79-90
- [14] Chen HY, Kaya KD, Dong L, et al. Three-dimensional retinal organoids from mouse pluripotent stem cells mimic in vivo development with enhanced stratification and rod photoreceptor differentiation[J]. Mol Vis, 2016, 22: 1077-1094
- [15] Shirai H, Mandai M, Matsushita K, et al. Transplantation of human embryonic stem cell-derived retinal tissue in two primate models of retinal degeneration [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2016, 113(1): E81-90
- [16] Boucherie C, Mukherjee S, Henckaerts E, et al. Brief Report: Self-Organizing Neuroepithelium from Human Pluripotent Stem Cells Facilitates Derivation of Photoreceptors [J]. Stem cells, 2013, 31(2): 408-414
- [17] Wang X, Xiong K, Lin C, et al. New medium used in the differentiation of human pluripotent stem cells to retinal cells is comparable to fetal human eye tissue [J]. Biomaterials, 2015, 53: 40-49
- [18] Matrisciano F, Busceti CL, Bucci DH, et al. Induction of the Wnt antagonist Dickkopf-1 is involved in stress-induced hippocampal damage[J]. PLoS One, 2011, 6(1): e16447
- [19] Bayod S, Menella I, Sanchez-Roige S, et al. Wnt pathway regulation by long-term moderate exercise in rat hippocampus [J]. Brain Res, 2014, 1543: 38-48
- [20] Zhou S, Flamier A, Abdouh M, et al. Differentiation of human embryonic stem cells into cone photoreceptors through simultaneous inhibition of BMP, TGF β and Wnt signaling [J]. Development, 2015, 142(19): 3294-3306
- [21] Osakada F, Ikeda H, Mandai M, et al. Toward the generation of rod and cone photoreceptors from mouse, monkey and human embryonic stem cells[J]. Nat Biotechnol, 2008, 26(2): 215-224
- [22] Zheng F, Puppel A, Huber SE, et al. Activin Controls Ethanol Potentiation of Inhibitory Synaptic Transmission Through GABAA Receptors and Concomitant Behavioral Sedation [J]. Neuropsychopharmacology, 2016, 41(8): 2024-2033
- [23] Link AS, Zheng F, Alzheimer C, et al. Activin Signaling in the Pathogenesis and Therapy of Neuropsychiatric Diseases[J]. Front Mol Neurosci, 2016, 9: 32
- [24] Maden M. Retinoic acid in the development, regeneration and maintenance of the nervous system [J]. Nat Rev Neuro, 2007, 8(10): 755-765
- [25] Chambers SM, Fasano CA, Papapetrou EP, et al. Highly efficient neural conversion of human ES and iPS cells by dual inhibition of SMAD signaling[J]. Nat Biotechnol, 2009, 27(3): 275-280
- [26] Lamba DA, Karl MO, Ware CB, et al. Efficient generation of retinal progenitor cells from human embryonic stem cells[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006, 103(34): 12769-12774
- [27] Mellough CB, Collin J, Khazim M, et al. IGF-1 Signaling Plays an Important Role in the Formation of Three-Dimensional Laminated Neural Retina and Other Ocular Structures From Human Embryonic Stem Cells[J]. Stem cells, 2015, 33(8): 2416-2430
- [28] Ikeda H, Osakada F, Watanabe K, et al. Generation of Rx+/Pax6+ neural retinal precursors from embryonic stem cells [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005, 102(32): 11331-11336
- [29] 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
- [30] Lamba DA, McUsic A, Hirata RK, et al. Generation, purification and transplantation of photoreceptors derived from human induced pluripotent stem cells[J]. PLoS One, 2010, 5(1): e8763
- [31] Phillips MJ, Wallace KA, Dickerson SJ, et al. Blood-derived human iPS cells generate optic vesicle-like structures with the capacity to form retinal laminae and develop synapses[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2012, 53(4): 2007-2019
- [32] Meyer JS, Howden SE, Wallace KA, et al. Optic vesicle-like structures derived from human pluripotent stem cells facilitate a customized approach to retinal disease treatment[J]. Stem Cells, 2011, 29(8): 1206-1218
- [33] Bratt-Leal AM, Carpenedo RL, McDevitt TC. Engineering the embryoid body microenvironment to direct embryonic stem cell differentiation[J]. Biotechnol Prog, 2009, 25(1): 43-51
- [34] Mellough CB, Sernagor E, Moreno-Gimeno I, et al. Efficient Stage-Specific Differentiation of Human Pluripotent Stem Cells Toward Retinal Photoreceptor Cells[J]. Stem cells, 2012, 30(4): 673-686
- [35] Chou BK, Gu H, Gao Y, et al. A facile method to establish human induced pluripotent stem cells from adult blood cells under feeder-free and xeno-free culture conditions: a clinically compliant approach[J]. Stem Cells Transl Med, 2015, 4(4): 320-332

- [3] Goyette P, Boucher G, Mallon D, et al. High-density mapping of the MHC identifies a shared role for HLA-DRB1 [ast] 01: 03 in inflammatory bowel diseases and heterozygous advantage in ulcerative colitis[J]. *Nature genetics*, 2015, 47(2): 172-179
- [4] Cioffi M, Rosa A D, Seroo R, et al. Laboratory markers in ulcerative colitis: Current insights and future advances [J]. *World journal of gastrointestinal pathophysiology*, 2015, 6(1): 13-22
- [5] Kevans D, Waterman M, Milgrom R, et al. Serological markers associated with disease behavior and response to anti tumor necrosis factor therapy in ulcerative colitis[J]. *Journal of gastroenterology and hepatology*, 2015, 30(1): 64-70
- [6] Gibson D J, Heetun Z S, Redmond C E, et al. An accelerated infliximab induction regimen reduces the need for early colectomy in patients with acute severe ulcerative colitis [J]. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 2015, 13(2): 330-335. e1
- [7] Tariq R, Smyrk T, Pardi D S, et al. New-Onset Microscopic Colitis in an Ulcerative Colitis Patient After Fecal Microbiota Transplantation [J]. *The American journal of gastroenterology*, 2016, 111(5): 751-752
- [8] Arias M T, Castele N V, Vermeire S, et al. A panel to predict long-term outcome of infliximab therapy for patients with ulcerative colitis [J]. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 2015, 13(3): 531-538
- [9] Lord J, Chen J, Thirlby R C, et al. T-cell receptor sequencing reveals the clonal diversity and overlap of colonic effector and FOXP3+ T cells in ulcerative colitis [J]. *Inflammatory bowel diseases*, 2015, 21(1): 19-30
- [10] Taylor K M, Sparrow M P. Editorial: tacrolimus vs. anti tumour necrosis factor agents for moderately to severely active ulcerative colitis [J]. *Alimentary pharmacology & therapeutics*, 2016, 43(9): 1016-1017
- [11] Travis S P L, Schnell D, Feagan B G, et al. The impact of clinical information on the assessment of endoscopic activity: characteristics of the ulcerative colitis endoscopic index of severity [UCEIS] [J]. *Journal of Crohn's and Colitis*, 2015, 9(8): 607-616
- [12] Skowron K B, Lapin B, Rubin M, et al. Clostridium Difficile Infection in Ulcerative Colitis: Can Alteration of the Gut-associated Microbiome Contribute to Pouch Failure? [J]. *Inflammatory bowel diseases*, 2016, 22(4): 902-911
- [13] Cesarini M, Collins G, Ronnblom A, et al. Predicting the risk of acute severe colitis (ASC) at diagnosis of Ulcerative Colitis (UC): external validation[J]. *Journal of Crohn's and Colitis*, 2015, 9(1): S77-S443
- [14] Kisiel J B, Loftus E V. Editorial: Clarity and Caution in the Natural History of Low-Grade Dysplasia in Ulcerative Colitis [J]. *The American journal of gastroenterology*, 2015, 110(10): 1473-1474
- [15] Lasso A, Stotzer P O, Öhman L, et al. The intra-individual variability of faecal calprotectin: a prospective study in patients with active ulcerative colitis[J]. *Journal of Crohn's and Colitis*, 2015, 9(1): 26-32
- [16] Brandse J F, van den Brink G R, Wildenberg M E, et al. Loss of infliximab into feces is associated with lack of response to therapy in patients with severe ulcerative colitis[J]. *Gastroenterology*, 2015, 149(2): 350-355. e2
- [17] Leowardi C, Schneider M L, Hinz U, et al. Prognosis of Ulcerative Colitis-Associated Colorectal Carcinoma Compared to Sporadic Colorectal Carcinoma: A Matched Pair Analysis [J]. *Annals of surgical oncology*, 2016, 23(3): 870-876
- [18] 张凌玲, 王素娟, 龙再菊, 等. 溃疡性结肠炎患者外周血 C 反应性蛋白、血清降钙素原及白细胞介素 -6 水平及临床意义[J]. *现代生物医学进展*, 2016, 16(26): 5166-5168
- Zhang Ling-ling, Wang Su-juan, Long Zai-ju, et al. Levels and Significance of Serum PCT, CRP and IL-6 in Patients with Ulcerative Colitis[J]. *Progress in Modern Biomedicine*, 2016, 16(26): 5166-5168
- [19] Cleynen I, Boucher G, Jostins L, et al. Inherited determinants of Crohn's disease and ulcerative colitis phenotypes: a genetic association study[J]. *The Lancet*, 2016, 387(10014): 156-167
- [20] Kobayashi T, Suzuki Y, Motoya S, et al. First trough level of infliximab at week 2 predicts future outcomes of induction therapy in ulcerative colitis-results from a multicenter prospective randomized controlled trial and its post hoc analysis [J]. *Journal of gastroenterology*, 2016, 51(3): 241-251

(上接第 2800 页)

- [36] Assawachananont J, Mandai M, Okamoto S, et al. Transplantation of embryonic and induced pluripotent stem cell-derived 3D retinal sheets into retinal degenerative mice [J]. *Stem Cell Reports*, 2014, 2(5): 662-674
- [37] Zhong X, Gutierrez C, Xue T, et al. Generation of three-dimensional retinal tissue with functional photoreceptors from human iPSCs[J]. *Nat Commun*, 2014, 5: 4047
- [38] Zhou L, Wang W, Liu Y, et al. Differentiation of induced pluripotent stem cells of swine into rod photoreceptors and their integration into the retina[J]. *Stem Cells*, 2011, 29(6): 972-980
- [39] Hara A, Aoli H, Takamatsu M, et al. Human embryonic stem cells transplanted into mouse retina induce neural differentiation [J]. *Stem Cells Cancer Stem Cells*, 2012, 2: 291-298
- [40] Croze RH, Buchholz DE, Radeke MJ, et al. ROCK inhibition extends passage of pluripotent stem cell-derived retinal pigmented epithelium [J]. *Stem Cells Transl Med*, 2014, 3(9): 1066-1078
- [41] Zhong X, Gutierrez C, Xue T, et al. Generation of three-dimensional retinal tissue with functional photoreceptors from human iPSCs[J]. *Nat Commun*, 2014, 5: 4047
- [42] Song MJ, Bharti K. Looking into the future: Using induced pluripotent stem cells to build two and three dimensional ocular tissue for cell therapy and disease modeling [J]. *Brain Res*, 2016, 1638(Pt A): 2-14
- [43] Reichman S, Goureau O. Production of Retinal Cells from Confluent Human iPS Cells[J]. *Methods Mol Biol*, 2016, 1357: 339-351