

· 实验研究 ·

无动物源性成分培养体系快速诱导人胚胎干细胞向视网膜色素上皮细胞的分化

刘秋慧 王菁 田蓉 王肖 曹迪 卢晶 罗燕

510060 广州,中山大学中山眼科中心 眼科学国家重点实验室

通信作者:罗燕,Email:luoyan2@mail.sysu.edu.cn

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2016.06.002

【摘要】 背景 随着视网膜色素上皮(RPE)细胞视网膜下腔移植治疗年龄相关性黄斑变性(AMD)研究的开展,需要优化无动物源性成分(xeno-free)培养体系快速定向诱导人胚胎干细胞(hESCs)向RPE细胞分化以满足日渐增长的科研及临床需要。目的 建立xeno-free培养体系,优化快速诱导hESCs向RPE细胞分化的方法。方法 将hESCs克隆团接种至Vitronectin XFTM,在培养液中加入50 ng/ml noggin、10 ng/ml DKK-1以及10 ng/ml 胰岛素样生长因子-1(IGF-1)培养2 d,第2~4天将培养液中noggin质量浓度减至10 ng/ml,并加入5 ng/ml 碱性成纤维细胞生长因子(bFGF),第4~6天移除培养液中的noggin和bFGF,第8~14天培养液中加入1 μmol/L CHIR99021。倒置显微镜下观察ESCs在分化为RPE细胞过程中的形态变化,免疫荧光染色检测细胞内特异性抗原的表达以对分化细胞进行鉴定,实时荧光定量PCR(qRT-PCR)法检测细胞分化过程中RPE细胞特异性蛋白mRNA的相对表达变化量。结果 分化培养第14天,部分细胞呈多角形并呈现铺路石样排列,且细胞内可见色素颗粒;培养第35天,诱导分化的细胞内表达RPE细胞特异性抗原Mitf及RPE65;培养至第60天,细胞内富含黑色素颗粒且呈规则六边形。与诱导分化前比较,诱导分化第7天和第14天hES-RPE细胞中Mitf mRNA的表达量分别增加了(3.43±2.77)倍和(8.91±2.83)倍,而RPE65 mRNA的表达量分别增加了(14.60±3.94)倍和(87.16±9.32)倍,分化第7天和第14天细胞中的Mitf mRNA和RPE65 mRNA的相对表达量均明显高于分化前,差异均有统计学意义(均P<0.05)。结论 hESCs可在含尼克酰胺、DKK-1、noggin、IGF-1和CHIR99021的xeno-free优化培养体系中快速分化为RPE细胞。

【关键词】 胚胎干细胞/药物作用;细胞培养技术/方法;细胞分化;视网膜色素上皮;培养液/药物作用;细胞株;人;无动物源性

基金项目: 国家重点基础研究发展计划973项目(2013CB967004);国家自然科学基金项目(81371020)

Rapid differentiation of human ESCs into RPE cells by defined xeno-free culture system Liu Qiuhui, Wang

Jing, Tian Rong, Wang Xiao, Cao Di, Lu Jing, Luo Yan

State Key Laboratory of Ophthalmology, Zhongshan Ophthalmic Center, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510060, China

Corresponding author: Luo Yan, Email: luoyan2@mail.sysu.edu.cn

【Abstract】 **Background** Subretinal transplantation of retinal pigment epithelium (RPE) cells for the treatment of age-related macular degeneration (AMD) have accelerated the drive to develop xeno-free cultivation system that support the rapid differentiation of human embryonic stem cells (hESCs) into ES-RPE cells. **Objective** This study was to report a modified xeno-free culture system and method for accelerating derivation of hESCs to differentiate into RPE cells. **Methods** This study was approved by Ethic Committee of Zhongshan Ophthalmic Center. HESC H1 line was cloned and cultured in Vitronectin XFTM-coated 6-well dish with xenogenetic-free medium. Cells were cultured in 50 ng/ml noggin, 10 ng/ml DKK-1 and 10 ng/ml insulin like growth factor-1 (IGF-1) medium for 2 days, and then the concentration of noggin was decreased to 10 ng/ml and 5 ng/ml basic fibroblast growth factor (bFGF) and cultured for the following 2 days. Sequentially, noggin and bFGF were removed and cultured for 2 days. Finally, 1 μmol/L CHIR99021 was added in medium for 6 days. Morphological changes in the progress of ESCs differentiation into RPE were observed by Living Cell Imaging System. The expression of Mitf and RPE65, RPE cells-

specific markers, in the cells were detected by immunofluorescence technique, and the relative expression levels of RPE cells-specific marker mRNA were assayed using real time fluorescent quantitation PCR. **Results** Polygonal-shape monolayer cells which contained pigments were initially observed at day 14 after cultured with the cobblestone-like arrangement. Mitf and RPE65 were strongly expressed in the hES-derived RPE cells 35 days after induced, showing red fluorescence, and the cells presented hexagonal shape at cultured day 60 with numerous pigment granules in cytoplasm. Compared with before differentiation, the expression levels of Mitf mRNA in hES-RPE cells increased by (3.43 ± 2.77) folds and (8.91 ± 2.83) folds, and the expression levels of RPE65 mRNA increased by (14.60 ± 3.94) folds and (87.16 ± 9.32) folds at day 7 and day 14 after differentiation, respectively (all at $P < 0.05$).

Conclusions A defined xeno-free culture system is successfully established by adding niacinamide, DKK-1, noggin, IGF-1 and CHIR99021 in xeno-free medium, and this system can accelerate the derivation and differentiation of hESCs into RPE-like cells.

[Key words] Embryonic stem cells/drug effect; Cell culture techniques/methods; Cell differentiation; Retinal pigment epithelium; Culture media/drug effects; Cell line; Humans; Xeno-free

Fund program: National Program on Key Basic Research Project (973 Program) (2013CB967004); National Natural Science Foundation of China (81371020)

年龄相关性黄斑变性 (age-related macular degeneration, AMD) 是西方发达国家 65 岁及以上人群首位致盲病因, 亦是中国 65 岁以上人群重要的致盲疾病之一, 且随着人口的老齡化以及人类平均寿命的不断提高, AMD 的患病率逐年升高, 给患者家庭以及社会带来了极其沉重的负担^[1]。目前, 多种抗血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 药物被批准应用于治疗眼内新生血管性疾病, 给湿性 AMD 的治疗带来了突破性的进展, 然而, 针对干性 AMD 导致的视力下降尚无有效的防治方法。既往研究认为, 视网膜色素上皮 (retinal pigment epithelium, RPE) 细胞吞噬和屏障功能障碍和细胞凋亡在 AMD 的病理过程中起到关键作用^[1-2], 因此 RPE 细胞移植为干性 AMD 的治疗提供了新的途径。目前, 日本及美国学者已开展诱导多潜能干细胞源性 RPE (induced pluripotency stem cell derived retinal pigment epithelium, iPSC-RPE) 或胚胎干细胞源性视网膜色素上皮 (embryonic stem cell derived retinal pigment epithelium, ES-RPE) 细胞视网膜下移植治疗干性 AMD 的临床试验, 并取得了一定成效^[3-4], 但由于 iPSC 分化为 RPE 细胞大多存在耗时较长、方法复杂、可能受到异种动物源蛋白污染等问题, 故难以获得足量的治疗级细胞, 成为限制 hES-RPE 细胞临床应用的瓶颈之一。本研究中拟探索在无动物源性成分 (xeno-free) 培养体系中快速诱导人胚胎干细胞 (human embryonic stem cells, hESCs) 向 RPE 细胞分化的方法。

1 材料与方法

1.1 材料

hESC H1 株 (第三军医大学西南眼科医院阴正勤教授 973 项目组提供); TeSR™-E8™ 培养液、温和无酶细胞消化液、Vitronectin XF™、非组织培养板 (美国 Stemcell Technologies 公司); CTS™ KnockOut™ DMEM/F-12 培养液、CTS™ KnockOut™ DMEM 培养液、KnockOut™ SR XenoFree CTS™、CTS™ B-27 Supplement、CTS™ N-2 Supplement、CTS™ GlutaMAX™-I Supplement、非必需氨基酸溶液 (美国 Invitrogen 公司); noggin、DKK-1、胰岛素样生长因子-1 (insulin-like growth factor-1, IGF-1)、CHIR99021 (美国 R&D 公司); 兔抗人 OCT4 抗体 (ab18976, 1:200)、兔抗人 SOX2 抗体 (ab97959, 1:1000)、鼠抗人 Mitf 抗体 (ab122982, 1:250) (美国 Abcam 公司); 鼠抗人 RPE65 抗体 (NB100-355, 1:100) (美国 Novus 公司); Alexa Fluor® 555 标记山羊抗鼠 IgG、Alexa Fluor® 555 标记山羊抗兔 IgG (美国 CST 公司); PrimeScript™ RT Master Mix (大连 TaKaRa 公司); SYBR FAST qPCR Kit (美国 Kapa 公司); 尼克酰胺 (美国 Sigma 公司); RNeasy Mini Kit (美国 Qiagen 公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及分化的诱导 本实验已通过中山大学中山眼科中心伦理委员会审查批准。用 TeSR™-E8™ 及 Vitronectin XF™ 在 6 孔非组织培养板中培养 hESC H1 株, 将 1.5×10^6 hESCs 接种在 Vitronectin XF™ 包被的 6 孔非组织培养板中进行培养, 基础培养液为 DMEM/F12、体积分数 20% Knockout 血清替代物、1 倍 B27 Supplement、1 倍 N2 Supplement、1 倍 GlutaMAX™-I Supplement、1 倍 NEAA 和 10 mmol/L 尼克酰胺; 培养的第 0~2 天于培养液中加入 50 ng/ml

noggin、10 ng/ml DKK-1 以及 10 ng/ml IGF-1, 第 2~4 天培养液中加入 10 ng/ml noggin、10 ng/ml DKK-1、10 ng/ml IGF-1 以及 5 ng/ml 碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF), 第 4~6 天培养液中加入 10 ng/ml DKK-1 和 10 ng/ml IGF-1, 第 8~14 天培养液中加入 1 μ mol/L CHIR99021。诱导培养结束后将非 RPE 形态细胞刮除, 将 RPE 样细胞用 TrypLE™ Express 消化后接种在 Vitronectin XF™ 上, 用 DMEM+20% Knockout 血清替代物继续培养细胞。第 2~3 代 hES-RPE 细胞用于后续研究。

1.2.2 诱导细胞的免疫荧光鉴定 细胞消化后接种于置有无菌盖玻片的 24 孔板中, 待细胞爬满培养板后用灭菌 PBS 清洗 3 遍, 质量分数 3.7% 多聚甲醛固定 15 min, PBS 洗 3 次, 渗透打孔剂(含质量分数 0.1% Triton-X100 的质量分数 1% BSA)打孔 15 min, PBS 洗 3 次, 1% BSA 室温下封闭 1 h, 滴加相应一抗, 4 $^{\circ}$ C 湿盒孵育过夜, PBS 洗 3 次; 滴加 1:400 二抗, 37 $^{\circ}$ C 避光孵育 60 min, 避光 PBS 洗 3 次, DAPI 孵育 5 min, 避光 PBS 洗 3 次, 抗荧光衰减封片剂封片。

1.2.3 实时荧光定量 PCR 法检测细胞中各种相关因子基因的相对表达 按照 RNeasy Mini Kit 说明书操作提取细胞裂解液中的核酸。采用 DNase I 去除 RNA 样本中可能含有的基因组 DNA, 紫外分光光度计测定 RNA 浓度及纯度。取 1 μ g RNA 在逆转录酶的作用下合成 cDNA。配制 20 μ l 的 PCR 反应体系: 每组包含 SYBR Green PCR Master Mix 10 μ l, 上下游引物各 1 μ l, cDNA 2 μ l, RNase-free 水 6 μ l。各引物均由上海英潍捷基公司合成, 引物序列见表 1, 以 β -actin 为内参。反应条件: 95 $^{\circ}$ C 预变性 3 min; 95 $^{\circ}$ C 变性 3 s, 60 $^{\circ}$ C 退火 20 s, 共 40 个循环。根据荧光定量 PCR 仪提供的相应 Ct 值以及公式 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 得到目的基因的相对表达水平。实验重复 3 次, 取平均值。

表 1 目的基因引物序列

目的基因	引物序列	产物大小(bp)
β -actin	F: 5'-CTCTGGCCGTACCACTGGC-3'	171
	R: 5'-GTGAAGCTGTAGCCCGC-3'	
Mitf	F: 5'-CCAAGCCTATAGTGTCCCA-3'	110
	R: 5'-GGGACACTGAGGAAAGGAGT-3'	
RPE65	F: 5'-TTGGATCTGAGCCATTTTACCAC-3'	236
	R: 5'-GTCAGTAACTCTACTCCTCGAA-3'	

注: RPE: 视网膜色素上皮

1.3 统计学方法

采用 SPSS 16.0 统计学软件进行统计分析。分化过程中 RPE 细胞特异性蛋白 mRNA 相对表达量经 Shapiro-Wilk 检验呈正态分布, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间均数经 Levene 检验证实方差齐。采用均衡分组单因素干预多水平实验设计, 诱导分化不同时间点细胞中 RPE 细胞特异性标志物 mRNA 相对表达水平的总体比较采用单因素方差分析, 两两比较采用 Dunnett *t* 检验。P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 hESCs 及 hES-RPE 细胞的形态特点

倒置相差显微镜下可见无饲养层细胞条件下培养的 hESCs 呈克隆样生长, 细胞克隆边缘清晰, 呈规则小圆形, 细胞核质比高, 核仁突出。将 hESCs 克隆团块贴壁接种在 Vitronectin XF™ 包被的培养板上并用 xeno-free 分化培养液诱导后, 倒置显微镜下可见 hESCs 由规则圆形逐渐变为多角形, 核质比逐渐下降。诱导分化第 7 天细胞的细胞质内可见到少许色素颗粒; 诱导分化第 14 天, 细胞呈铺路石样外观, 细胞内可见黑色素颗粒。诱导分化第 60 天, 细胞生长至融合状态, 细胞大小均一, 连接紧密, 细胞内含有大量色素颗粒, 呈棕黑色规则六边形(图 1)。

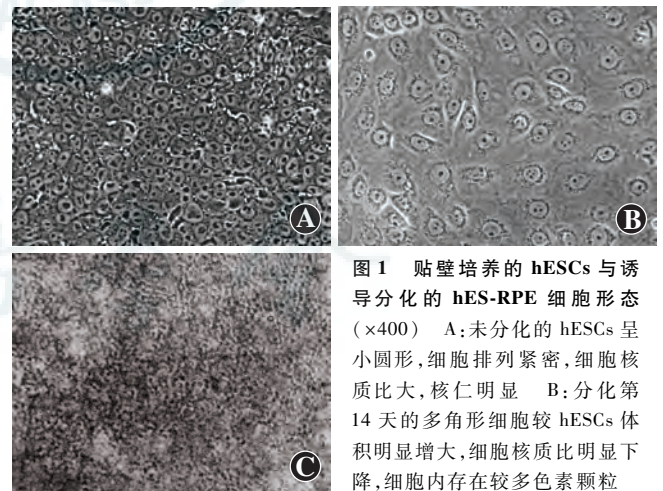


图 1 贴壁培养的 hESCs 与诱导分化的 hES-RPE 细胞形态 ($\times 400$) A: 未分化的 hESCs 呈小圆形, 细胞排列紧密, 细胞核质比大, 核仁明显 B: 分化第 14 天的多角形细胞较 hESCs 体积明显增大, 细胞核质比明显下降, 细胞内存在较多色素颗粒

C: 培养第 60 天的细胞呈规则六边形, 细胞内含有大量色素颗粒

2.2 hESCs 和 RPE 细胞中特异性蛋白的表达

免疫荧光染色检测结果显示, hESCs 细胞核内可见 iPSC 特征性转录因子 OCT-4 和 SOX2 的阳性表达, 呈红色荧光, 细胞核被 DAPI 标记为蓝色荧光。hESCs 培养 20 d 时分化得到的 ESCs 源性 RPE 细胞的细胞质和细胞核内可见 RPE 细胞标志物 Mitf 的阳性表达, 呈

红色荧光,细胞核被 DAPI 标记为蓝色荧光。培养 35 d 时细胞质内可见 RPE 细胞标志性蛋白 RPE65 的阳性表达,呈红色荧光,细胞核被 DAPI 标记,呈蓝色荧光(图 2)。

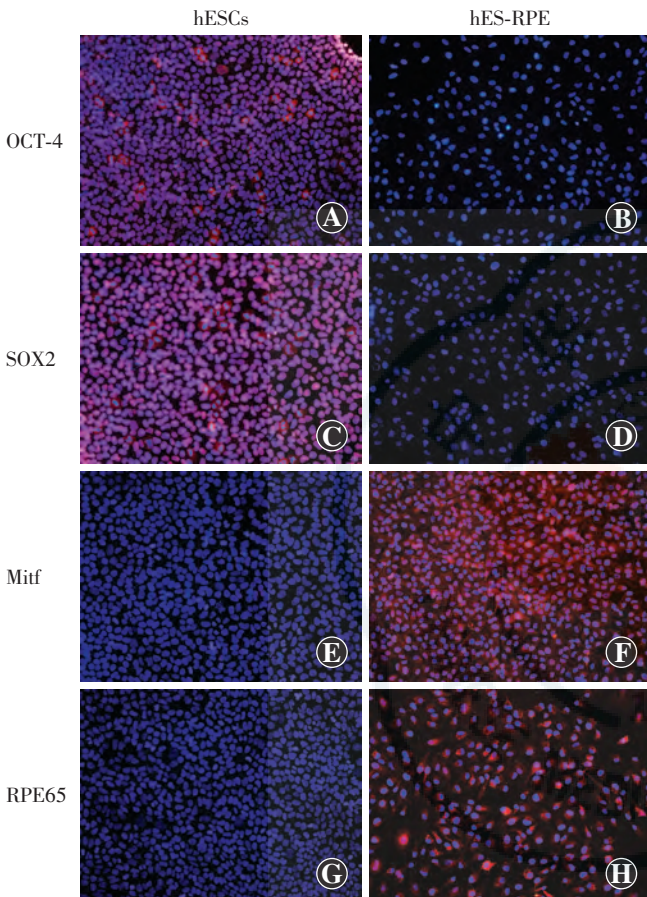


图 2 hESCs 及 hES-RPE 细胞特异性蛋白的表达($\times 200$) 免疫荧光染色后正置荧光显微镜下观察可见培养的 hESCs 细胞核内 iPSC 标志物 OCT-4 表达阳性(A),而 hES-RPE 细胞核内不表达 OCT-4(B);培养的 hESCs 细胞核内 iPSC 标志物 SOX2 表达呈阳性(C),但 hES-RPE 细胞核内不表达 SOX2(D);hESCs 细胞核及细胞质内不表达 Mitf(E),但 hES-RPE 细胞质及细胞核内均表达 Mitf(F);hESCs 细胞质中未见 RPE65 表达(G),而 hES-RPE 细胞质内可表达 RPE65(H) hESCs:人胚胎干细胞;hES-RPE:人胚胎干细胞源性视网膜色素上皮细胞

2.3 细胞分化过程中 RPE 细胞标志物 mRNA 的相对表达量

各时间点细胞中 Mitf mRNA 和 RPE65 mRNA 表达量的总体比较差异均有统计学意义(Mitf mRNA: $F=9.39, P=0.01$; RPE65 mRNA: $F=188.70, P<0.01$)。与未分化细胞比较,分化培养第 7 天和第 14 天细胞内 RPE 细胞特异性蛋白 Mitf mRNA 及 RPE65 mRNA 表达量均显著增高,差异均有统计学意义(均 $P<0.05$) (表 2)。

表 2 细胞诱导分化不同时间点 RPE 细胞特异性标志物 mRNA 相对表达量比较($\bar{x}\pm s$)

时间	样本量	Mitf mRNA	RPE65 mRNA
未分化	3	1.00±0.00	1.00±0.00
分化培养第 7 天	3	3.43±2.77 ^a	14.60±3.94 ^a
分化培养第 14 天	3	8.91±2.83 ^a	87.16±9.32 ^a
F		9.39	188.70
P		0.01	<0.01

注:与未分化比较,^a $P<0.05$ (单因素方差分析, Dunnett *t* 检验)

RPE:视网膜色素上皮

3 讨论

ESCs 具有无限扩增和多向分化潜能的特点,自 1981 年被分离、培养、纯化以来,即被认为是一系列不可逆性组织或细胞功能障碍性疾病的治愈希望。近年来,美国开展的 hES-RPE 细胞移植二期临床试验中长期结果表明,hES-RPE 细胞悬液移植提高了 50% 以上患者的最佳矫正视力^[3]。随着 hES-RPE 细胞临床应用的逐渐增多,如何快速、高效地获得治疗级细胞成为迫切需要解决的问题。

目前,常用的诱导 ESCs 向 RPE 细胞分化的方法主要有自发分化和三维拟胚体诱导分化 2 种。自发分化是最早报道的 RPE 细胞诱导分化方法,将 ESCs 培养至融合状态后将培养液换为不含 bFGF 培养液,使部分 ESCs 自发分化为 RPE 细胞^[5],但此诱导方法诱导周期长达 8~12 周,效率仅为 1% 左右,难以满足日渐增长的科研及临床需求^[5-7]。最近, Pennington 等^[8]报道了 hESCs 可以在 Synthemax II-SC 与不含 bFGF 培养液构成的 xeno-free 培养体系中自发分化为 RPE 细胞,分化得到的 hES-RPE 细胞种植在聚氯代对二甲苯 (parylene-C) 膜上后仍可保持稳定功能;然而在该培养体系中,色素细胞约在分化 30 d 时开始出现,色素细胞达到可分选数量约需 115 d,仍需要较长的培养周期。为了缩短诱导周期,提高诱导效率,科研工作者模拟了 RPE 细胞的体内发育环境进行 RPE 细胞诱导分化。在胚胎发育早期, BMP 通路及经典 Wnt/-catenin 通路的抑制对于视泡形成起到决定性作用。Noggin 和 DKK-1 可分别阻断分化细胞的 BMP 及 Wnt/-catenin, 促进 hESCs 向视网膜祖细胞分化,因此提高 ESCs 向 RPE 细胞分化的效率并加快分化速度^[9]。

尼克酰胺可通过抑制多腺苷二磷酸多聚酶活性,减少了诱导过程中的细胞凋亡,因此具有促进 ESCs 向 RPE 细胞分化的作用^[9]。IGF-1 通过激活细胞内的酪氨酸激酶对脑的发育起着重要的调控作用^[10]。研究证明,分化早期在悬浮培养系统通过添加 noggin、

DKK-1、尼克酰胺和 IGF-1 阻断 Wnt、Nodal、BMP 等通路诱导 ESCs 向神经外胚层发育,晚期上调 TGF- β /Activin 等信号通路诱导神经外胚层细胞向 RPE 细胞分化,可以较快速地得到 RPE 细胞^[11-13]。然而,从三维拟胚体中分离色素上皮细胞需要耗费大量的时间和人力,分离色素细胞团块时可能伴随神经细胞污染,需要进行二次纯化,且在培养过程中为促进拟胚体生长常需要添加血清,导致培养细胞被异种动物源蛋白污染。Buchholz 等^[9]报道了在二维环境中诱导 ESCs 向 RPE 细胞分化的方法,在研究中添加高浓度的 noggin、DKK-1 和 Activin A 后,色素上皮样细胞在培养第 14 天开始出现,然而该研究的培养方法中使用了基质胶、胎牛血清等含动物源性蛋白的成分,难以满足临床需求。本研究中使用 xeno-free 的二维培养体系快速诱导 hESCs 向 RPE 细胞分化。与 Buchholz 等^[9]不同的是,本研究在分化早期添加尼克酰胺、noggin、DKK-1 及 IGF-1 诱导 hESCs 向视网膜前体细胞分化后,通过激活细胞的 Wnt 通路诱导其从视网膜前体细胞向 RPE 细胞分化。

研究表明,Wnt 通路在胚胎发育过程中对 RPE 细胞的分化发育起到多重作用。在胚胎发育过程中,Wnt 通路时序性抑制与激活对于神经视网膜及 RPE 形成起到非常重要的作用。视杯形成早期的 Wnt 通路高表达常引起端脑发育不良,眼域缩小;而视杯发育晚期的 Wnt 通路抑制将导致 RPE 细胞缺失。Wnt 通路还可联合 Mitf 转录因子调控、促进 RPE 细胞发育,起到平衡 RPE 与神经上皮层发育的作用^[6]。Nakano 等^[14]研究表明,Wnt 通路激活剂 CHIR99021 可诱导体外三维培养的视杯形成表达 Mitf 的上皮细胞层。在本研究中,ESCs 在分化诱导培养液中诱导 14 d 后,开始表达 RPE 细胞特异性转录因子 Mitf,进一步培养细胞至 30 d,细胞的细胞质中表达 RPE 细胞特异性抗原 RPE65,提示细胞进一步分化成熟。相比于传统从悬浮培养的拟胚体中挑选色素细胞的三维诱导培养方式,本研究使用了二维培养方法,避免了从球形拟胚体中分离色素细胞的繁琐步骤,得到的 hES-RPE 细胞品质更稳定。在本研究中使用的优化 xeno-free 培养体系中,诱导培养周期约为 35 d,相比于在无 bFGF 培养系统中 hESCs 自发分化诱导 RPE 细胞的方法,优化的 xeno-free 培养体系缩短了培养周期,并大大提高了诱导效率,且 Wnt 通路激活剂 CHIR99021 的加入减少了昂贵细胞因子血管活性肠肽和 Activin A 等的使用,在一定程度上降低了实验成本。

本研究中成功在二维培养系统中使用 xeno-free 培养体系快速诱导 ESCs 分化为 RPE 细胞,可为 hES-RPE 细胞的临床应用提供充足且稳定的细胞来源。

参考文献

- [1] Ambati J, Atkinson JP, Gelfand BD. Immunology of age-related macular degeneration [J]. *Nat Rev Immunol*, 2013, 13 (6) : 438-451. DOI:10.1038/nri3459.
- [2] Lim LS, Mitchell P, Seddon JM, et al. Age-related macular degeneration [J]. *Lancet*, 2012, 379 (9827) : 1728-1738. DOI: 10.1016/S0140-6736(12)60282-7.
- [3] Schwartz SD, Regillo CD, Lam BL, et al. Human embryonic stem cell-derived retinal pigment epithelium in patients with age-related macular degeneration and Stargardt's macular dystrophy: follow-up of two open-label phase 1/2 studies [J]. *Lancet*, 2015, 385 (9967) : 509-516. DOI:10.1016/S0140-6736(14)61376-3.
- [4] Schwartz SD, Hubschman JP, Heilwell G, et al. Embryonic stem cell trials for macular degeneration: a preliminary report [J]. *Lancet*, 2012, 379(9817) : 713-720. DOI:10.1016/S0140-6736(12)60028-2.
- [5] Liao JL, Yu J, Huang K, et al. Molecular signature of primary retinal pigment epithelium and stem-cell-derived RPE cells [J]. *Hum Mol Genet*, 2010, 19 (21) : 4229-4238. DOI:10.1093/hmg/ddq341.
- [6] Leach LL, Buchholz DE, Nadar VP, et al. Canonical/ β -catenin Wnt pathway activation improves retinal pigmented epithelium derivation from human embryonic stem cells [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2015, 56(2) : 1002-1013. DOI:10.1167/iovs.14-15835.
- [7] Bouchenaki N, Herbort CP. The contribution of indocyanine green angiography to the appraisal and management of Vogt-Koyanagi-Harada disease [J]. *Ophthalmology*, 2001, 108 (1) : 54-64.
- [8] Pennington BO, Clegg DO, Melkounian ZK, et al. Defined culture of human embryonic stem cells and xeno-free derivation of retinal pigmented epithelial cells on a novel, synthetic substrate [J]. *Stem Cells Transl Med*, 2015, 4(2) : 165-177. DOI:10.5966/sectm.2014-0179.
- [9] Buchholz DE, Pennington BO, Croze RH, et al. Rapid and efficient directed differentiation of human pluripotent stem cells into retinal pigmented epithelium [J]. *Stem Cells Transl Med*, 2013, 2(5) : 384-393. DOI:10.5966/sectm.2012-0163.
- [10] Vieira M, Gomes JR, Saraiva MJ. Transthyretin induces insulin-like growth factor I nuclear translocation regulating its levels in the hippocampus [J]. *Mol Neurobiol*, 2015, 51 (3) : 1468-1479. DOI:10.1007/s12035-014-8824-4.
- [11] 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. DOI: 10.1073/pnas.0500010102.
- [12] 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. DOI: 10.1073/pnas.0601990103.
- [13] Osakada F, Jin ZB, Hirami Y, et al. In vitro differentiation of retinal cells from human pluripotent stem cells by small-molecule induction [J]. *J Cell Sci*, 2009, 122 (Pt 17) : 3169-3179. DOI:10.1242/jcs.050393.
- [14] 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. DOI:10.1016/j.stem.2012.05.009.

(收稿日期:2016-03-11)

(本文编辑:尹卫靖 刘艳)